Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut
der Universität Göttingen

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN AN STÄMMEN DER VOLVOCALEN GRÜNALGE CHLAMYDOBOTRYS STELLATA

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Walter Sandrock
aus Sandershausen bei Kassel

Göttingen 1976

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut
der Universität Göttingen

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN AN STÄMMEN DER VOLVOCALEN GRÜNALGE CHLAMYDOBOTRYS STELLATA

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Walter Sandrock
aus Sandershausen bei Kassel

Göttingen 1976

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

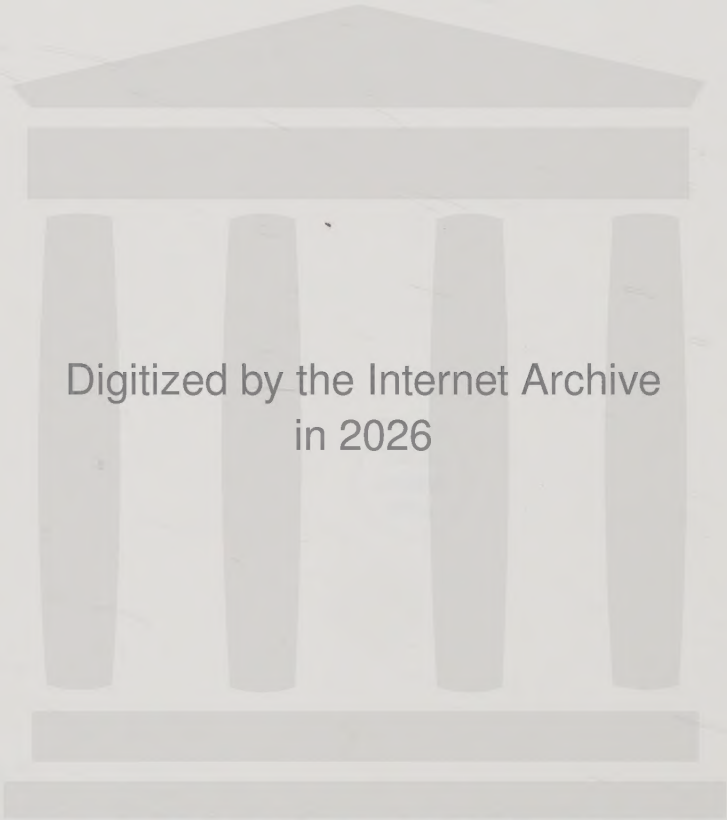
Referent: Prof. Dr. W. Wießner

Koreferent: Prof. Dr. A. Pirson

Tag der mündlichen Prüfung: 12.2.1976

Die vorliegende Arbeit wurde im Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Göttingen/Abteilung für Experimentelle Phykologie in der Zeit vom Oktober 1972 bis November 1975 durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. W. Wießner, danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit und für fördernde Diskussionen.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534921_0036

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	7
II. Material und Methoden	11
1. Versuchsobjekte	11
2. Kulturmedien	11
3. Kulturbedingungen	12
4. Analytische Methoden	13
5. Bestimmung der lichtabhängigen Essig= säureaufnahme aus der Nährlösung	14
6. Assimilation und Einbau von ^{14}C-markiertem Kohlendioxid und Na-Acetat	15
7. Polarographische Sauerstoffbestimmung	17
8. Bestimmung von Enzymaktivitäten	18
9. Energiebedarf der lichtabhängigen Essig= säureaufnahme	18
10. Aufnahme von Absorptionsspektren	19
11. Elektronenmikroskopische Methoden	20
III. Versuche und Ergebnisse	21
1. Vorbemerkung zu den Wachstumsversuchen	21
2. Wachstumsverhalten während der photo= autotrophen Kultur	24
a) Zusammenfassung	33

Seite

3. Wachstumsverhalten während der photo= heterotrophen Kultur 35

a) Zusammenfassung 44

4. Vergleich des Wachstumsverhaltens unter photoautotrophen und photoheterotrophen Ernährungsbedingungen 45

5. Die stoffwechselphysiologischen Leistungen in Abhängigkeit von den Ernährungsbeding= ungen 51

a) Die Photosyntheseleistung 53

b) Leistung der Carboxydismutase 57

c) Der Acetat-Stoffwechsel 60

1. Die lichtabhängige Essigsäureauf= nahme aus der Nährlösung 60

2. Assimilation und Einbau von ^{14}C-mar= kiertem Na-Acetat im Licht 61

3. Aktivität der Isocitratlyase 69

4. Assimilation und Einbau von ^{14}C-mar= kiertem Na-Acetat im Licht nach Ver= giftung mit DCMU und im Dunkeln 75

6. Energiebedarf der lichtabhängigen Essig= säureaufnahme während des photohetero= trophen Wachstums 83

7. Aufnahme von Absorptionsänderungen beim Übergang von photoautotrophen zu photo= heterotrophen Ernährungsbedingungen 86

Seite

8. Elektronenmikroskopische Befunde über die Chloroplastenstruktur der Chlamydobotrys-Stämme während photoautotrophen und photoheterotrophen Wachstums 96

IV. Diskussion 105

V. Zusammenfassung 116

VI. Literaturverzeichnis 119

I. Einleitung

Die volvocale Grünalgenart Chlamydobotrys wurde von Stein (1878) erstmalig beschrieben und der Spondylomoraceengattung als Spondylomorum quaternarum zugeordnet. Über die Untersuchungen der folgenden Jahrzehnte zur Nomenklatur, sowie zur axenischen Reinkultur und zu ernährungsphysiologischen Fragen hat Pringsheim 1960 und 1969 zusammenfassend berichtet. Als besonders schwierig stellte sich bald die taxonomische Beschreibung des Organismus aufgrund morphologischer Merkmale heraus. Nach Behlau (1935) ist: " die Mannigfaltigkeit der Zellformen und im Zusammenhang damit auch die Gestalt der Kolonien (eines Klones) ... so groß, daß man meinen möchte, verschiedene Arten vor sich zu haben ". Nur unvollständig konnte daher Pringsheim zwölf Stämme von Chlamydobotrys, die er aus - ihm von verschiedenen Fundorten im In- und Ausland zugeschickten oder selbst gesammelten - Erdproben bakterienfrei isoliert hatte, charakterisieren und morphologisch voneinander unterscheiden, weshalb er sie willkürlich in alphabetischer Reihenfolge bezeichnete und alle der Sammelart (Gruppe) Chlamydobotrys stellata zuordnete.

Innerhalb dieser Gruppe können die verschiedenen Chlamydobotrys-Stämme entweder a) als Variationen ein und derselben Art verstanden werden (Pascher 1925), die identisches Erbmaterial besitzen, oder b) jeder Stamm von Chl. stellata könnte eine genetisch eigenständige Varietät dieser Art sein. Drittens besteht die Möglichkeit c), daß jeder Stamm eine eigene Art

darstellt.

Bei ernährungsphysiologischen Untersuchungen fiel Stamm E durch optimales Wachstum besonders unter photoheterotrophen (Licht + Acetat) Kulturbedingungen auf, wodurch er sich gegenüber fast allen Grünalgenarten, Ausnahme Chlamydomonas mundana, auszeichnet. Er wurde daher genauer stoffwechselphysiologisch, biochemisch und cytologisch untersucht (29,30, 43,53,45,8,46,47,49,50,21). Eine Ausdehnung dieser Arbeiten auf andere Stämme unterblieb. Bislang ist ungeklärt, ob die bei diesen Untersuchungen festgestellten Besonderheiten des bisher bearbeiteten Stammes konstante Merkmale für den "Acetatflagellaten " Chl. stellata sind, oder ob sie vielleicht nur diesen einen Stamm E charakterisieren. Ziel dieser Arbeit war daher die vergleichende Untersuchung mehrerer Stämme von Chlamydobotrys stellata im Hinblick auf die oben angeführte Problematik.

Mit dieser Problemstellung ist im Zusammenhang mit der kosmopolitischen Verbreitung der Chlamydobotrys-Stämme die Frage eng verbunden, ob die aus unterschiedlichen Herkunftsgebieten isolierten Klone in ihren Merkmalen noch identisch sind, oder ob sich - bedingt durch Unterschiede in den jeweiligen geographischen und klimatischen Gegebenheiten - besondere Merkmale physiologischer und eventuell cytologischer Art bei den einzelnen Stämmen dieser spezialisierten Grünalge herausgebildet haben.

Zur Klärung dieser Fragen wurden drei Aufgabenbereiche bear=
beitet:

1. Wachstum: Analyse des Wachstums unter einheitlichen Er=
nährungsbedingungen durch Bestimmung der Substanzproduktion
und der biochemischen Zusammensetzung der Kulturen. Anwendung
photometrischer Methoden, sowie mathematischer Darstellungs=
verfahren und Vergleich der Wachstumsleistungen der Stämme.

Bei der Kultur der überprüften Chlamydobotrys-Stämme wurde
stets von den Ergebnissen der ernährungsphysiologischen Unter=
suchungen des Stammes E ausgegangen und die bei diesem Stamm
festgestellten Bedingungen zur optimalen axenischen Massen=
kultur (Pringsheim und Wießner 1960, Wießner 1968) auch auf
die Kultur der anderen Stämme übertragen. Die Frage nach den
für den jeweiligen Stamm günstigsten Kulturbedingungen wurde
bewußt offengelassen (Gaffron 1939), da nur unter für alle
Stämme identischen Versuchsbedingungen Unterschiede im Wachs=
tumsverhalten der Algenstämme miteinander verglichen werden
können. Würde man für jeden Stamm die jeweils optimalen Kul=
turbedingungen ermitteln und dann das Wachstumsverhalten der
Stämme unter diesen Bedingungen miteinander vergleichen, so
ließen die Befunde zwar Aussagen über die individuellen, unter=
schiedlichen Ernährungsbedürfnisse der einzelnen Stämme zu,
ein Vergleich des stoffwechselphysiologischen Verhaltens unter
vergleichbaren ernährungsphysiologischen Außenbedingungen ist
jedoch nicht mehr möglich.

Diese Voraussetzungen haben den Nachteil, daß verschiedene Stämme von Chl. stellata, die bisher nur in Erd-Wasser-Kulturen - nicht aber in dem für die axenische Massenkultur verwendeten Medium - kultivierbar sind, nicht in diese Arbeit mit einbezogen werden konnten, und diese Analyse sich auf nur einige der Chlamydobotrys-Stämme stützen muß: C,D,E,H und I.

2. Stoffwechsel: Überprüfung der Frage nach den stoffwechselphysiologischen Ursachen für das die verschiedenen Stämme charakterisierende Wachstumsverhalten durch Bestimmung der stoffwechselphysiologischen Leistung; insbesondere der Photosynthese und Essigsäureassimilation unter Anwendung polarographischer und titrametrischer Methoden sowie dem Einsatz ^{14}C-markierten Kohlendioxids und Na-Acetats.

3. Cytologie: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Chloroplastenstruktur mit dem Ziel, mögliche Parallelitäten im stoffwechselphysiologischen Verhalten und den cytologischen Gegebenheiten bei den Stämmen von Chl. stellata aufzudecken.

II. Material und Methoden

1. Versuchsobjekte

Versuchsobjekte dieser Arbeit waren die folgenden Stämme der volvocalen Grünalge Chlamydobotrys stellata 10-1 C,D,E,H und I der Sammlung von Algenkulturen des Pflanzenphysiologischen Institutes der Universität Göttingen. Die Stämme haben die folgende Herkunft: C = Okala, Florida/USA; D = Imst, Tirol/Österreich; E = Berlin/Deutschland; H = Neapel/Italien; I = Seattle, State of Washington/USA.

2. Kulturmedien

Die Stammkulturen des für die Untersuchungen benötigten Algenmaterials wurden in der Nährlösung A) unter sterilen Bedingungen in Flüssigkeitskulturen angezogen, während für die Versuche eine von Trypton, Hefe- und Fleisch-Extrakt freie Nährlösung B) verwandt wurde.

Zusammensetzung der Nährlösung A)

$CH_3COONa \cdot 3\ H_2O$	10%
Fleisch-Extrakt	10%
Hefe-Extrakt	10%
Trypton (Difco)	1%

Salze wie Nährlösung B)

Zusammensetzung der Nährlösung B)

CH_3COONa (wasserfrei)	$1{,}5 \cdot 10^{-2}$ (mol/l)
NH_4Cl	$2{,}3 \cdot 10^{-2}$

KH_2PO_4	$4{,}4 \cdot 10^{-4}$ (mol/l)
K_2HPO_4	$1{,}1 \cdot 10^{-3}$
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	$2{,}0 \cdot 10^{-4}$
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	$1{,}0 \cdot 10^{-4}$
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	$2{,}5 \cdot 10^{-5}$
H_3BO_3	$1{,}5 \cdot 10^{-6}$
$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$	$3{,}5 \cdot 10^{-7}$
$MnSO_4 \cdot 4\ H_2O$	$1{,}0 \cdot 10^{-7}$
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$	$4{,}0 \cdot 10^{-8}$
$Co(NO_3)_2 \cdot 6\ H_2O$	$3{,}5 \cdot 10^{-8}$
$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$	$2{,}0 \cdot 10^{-10}$
Titriplex III (Merck)	$5{,}5 \cdot 10^{-6}$

Nach dem Ansetzen der jeweiligen Lösung wurde ihr pH-Wert mit 1/10 n NaOH bzw. HCl auf 7,0 eingestellt, und die Nährlösung anschließend eine halbe Stunde autoklaviert. Die für den Organismus lebenswichtigen Vitamine B_1 (0,1 ml/l) = 0,2% und B_{12} (0,2 ml/l) = 0,01% wurden unter sterilen Bedingungen der autoklavierten Nährlösung hinzugegeben. Sämtliche verwendete Reagenzien waren p.a.-Reagenzien, mit Ausnahme der zugegebenen Vitamine.

3. Kulturbedingungen

Die Organismen wurden photoautotroph (Licht + CO_2) in Acetat freier Nährlösung B) angezogen. Als Kulturgefäße dienten die von Pirson und Lorenzen (1958) beschriebenen U-förmigen Kulturröhren aus Jenaer Glas in dem von Kuhl und Lorenzen (1964) beschriebenen Thermostaten bei 30° C und ca. 10^4 lux Dauer-

licht (Philipps Leuchtstoffröhren). Zur weiteren Kultur wurde das Algenmaterial in die von Wießner (1960) beschriebenen, eine sterile Probenentnahme ermöglichenden Kulturgefäße und in den ebenfalls bei Wießner (1960) beschriebenen Lichtthermostaten überführt. Als Kohlenstoffquelle wurde CO_2 (2 Vol.% in Luft) angeboten und durch tropfenweise Zugabe von 1 n NaOH der pH-Wert der Nährlösung von 7,0 ± 0,2 konstant gehalten.

In photoheterotrophen Kulturen (Licht + Acetat) wurde mit Luft begast, die durch mehrere Waschflaschen mit 40%-iger KOH geleitet und somit von CO_2 befreit worden war. Die mit dem Verbrauch von Acetat-Ionen verbundene Alkalisierung der Nährlösung wurde durch automatische Rücktitration (pH-Meter, Titrator TTT-1, Radiometer Kopenhagen) mit 30%-iger Essigsäure behoben und ein jeweils konstanter pH-Wert von 7,0 ± 0,2 erreicht.

4. Analytische Methoden

Zur Charakterisierung von Wachstum und Vermehrung sowie der biochemischen Zusammensetzung der Kulturen wurden folgende Größen bestimmt:

4.1. Die Dichte der Algensuspensionen, gemessen als Extinktion bei λ 1000 nm im Zeiss-Spektralphotometer (PMQ II).

4.2. Zellzahl: Hierzu wurde ein Tropfen Algensuspension aus der Kultur entnommen und mit Hilfe der Zählkammer " Thoma neu " (Albert Sass) die Zellzahl pro ml ermittelt. Um die Eigenbeweglichkeit der Organismen auszuschließen wurden diese vor jeder Zählung mit einem Tropfen 1/10 n HCl abgetötet. Jeder

Meßpunkt wurde aus mindestens fünf Zählungen gemittelt.

4.3. Gesamtkohlenhydrat: Bestimmung nach der Anthron-Methode in Anlehnung an Roe (1955).

4.4. Gesamtstickstoff: Bestimmung nach der Mikro-Kjeldahl-Methode. Zur Berechnung des Gesamtproteins wurden die Gesamtstickstoffwerte mit dem Faktor 6,25 multipliziert.

4.5. Pigmentgehalt: Die Chlorophyllbestimmungen erfolgten in Anlehnung an Mackinney (1941) durch Extraktion mit 80%-igem Aceton und Messung der Extinktion bei λ 663 und 645 nm im Spektralphotometer (Zeiss, PMQ II). Die Absolutwerte an Chlorophyllen wurden unter Verwendung des von Kirk (1968) entwickelten Nomograms mit einer Abweichung von ± 0,1 γ/ml ermittelt.

5. Bestimmung der lichtabhängigen Essigsäureaufnahme aus der Nährlösung

Zur Bestimmung der Photoassimilation von Acetat in vivo wurden die Algen nach ein bis zweitägiger autotropher Anzucht auf photoheterotrophe Ernährungsbedingungen umgestellt und nach 24 stündiger Kultur geerntet. Die Organismen aus 20 ml Kultursuspension wurden hierzu einmal abzentrifugiert (Zentrifuge: Ecco-Superior, III B), von überschüssiger Nährlösung befreit und in frischer, acetathaltiger Nährlösung (pH = 7,0) aufgenommen, die keine Stickstoffquelle enthielt und - verglichen mit der normalen Nährlösung - sehr schwach gepuffert war. Durch lichtmikroskopische Kontrollen wurde stets festgestellt, daß die Organismen durch die Vorbehandlung nicht geschädigt

worden waren. Die Messung der lichtabhängigen Acetataufnahme erfolgte in der bei Pringsheim und Wießner (1960), sowie Wießner und Gaffron (1964) beschriebenen Anlage bei einer Temperatur von 30° C und einer Beleuchtungsstärke von ca. 4 x 10^4 lux (Lichtquelle: 2000 Watt-Lampe, Hedler de Luxe). Die Algensuspensionen ($E_{\lambda\ 1000\ nm}$ = 1,2) befanden sich während des Versuchs 60 Minuten lang in einer seitlich belichteten viereckigen Glasküvette, in die eine mit einer Titrationsanlage (Kap. II.3.) verbundene Elektrode eintauchte. Die durch den lichtabhängigen Acetatverbrauch bedingte pH-Verschiebung wurde durch automatische Rücktitration mit 0,01 m Essigsäure ausgeglichen, deren Menge damit genau dem Essigsäureverbrauch durch die Algen entspricht. Als Bezugsgröße diente der Proteingehalt/ml Algensuspension während des Versuches.

6. Assimilation und Einbau von ^{14}C-markiertem Kohlendioxid und Na-Acetat

Den Kulturen wurden während der exponentiellen Wachstumsphase Proben von ca. 20 ml Algensuspension entnommen und diese einmal abzentrifugiert (Kap. II.5.). Die überständige Nährlösung, die im Falle photoheterotropher Kulturen Acetat enthielt, wurde verworfen und die Algen in frischer acetatfreier Nährlösung (pH = 7,0) aufgenommen, damit in allen Experimenten gleiche pH- und Nährlösungs-Bedingungen herrschten.
Versuche mit radioaktiv markiertem Na-Acetat und Hydrogenkarbonat wurden in Warburg-Gefäßen bei 30° C und 10^4 lux durchgeführt. Die Gefäße enthielten im Hauptraum 2 ml Algen-

suspension ($E_{\lambda 1000\ nm}$ = 1,3), in der Ansatzbirne 50 µCi carboxyl- bzw. methylmarkiertes Na-Acetat und im zentralen Einsatz 0,2 ml 20%-ige NaOH. Die Versuche mit ^{14}C-markiertem Na-Hydrogenkarbonat wurden bei NaOH-Abwesenheit durchgeführt.

Nach kurzer Adaptationszeit (5 Minuten) wurde das radioaktiv markierte Acetat bzw. das Hydrogenkarbonat zu den Algen gekippt und nach einer 15 minütigen Inkubationszeit der zelluläre Einbau von ^{14}C durch Überführen der Algen in eine Eis-Kältemischung beendet. Anschließend wurde die Natronlauge des Zentraleinsatzes vorsichtig in graduierte Zentrifugengläser überführt und mit Nährlösung auf ein Volumen von 1,0 ml aufgefüllt. Hiervon wurden 0,1 ml in Polyäthylenfläschchen (NEN 938, Fa. NEN Chemicals) gebracht und mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt (Aquasol, Universal LSC Cocktail, NEF 934). Die Algen wurden aus den Warburggefäßen in Zentrifugengläser überführt, abzentrifugiert, zweimal mit kalter Nährlösung gewaschen und auf das Ausgangsvolumen von 2,1 ml aufgefüllt; 0,1 ml davon wurden ebenfalls zur Messung der Radioaktivität verwendet.

Jede Probe wurde mit dem Tri-Card, Liquid Scintillation Spectrometer (Model 2450) der Packard-Instruments-Company, Illinois /USA 10 Minuten lang gezählt. Es ergab sich im Durchschnitt ein mittlerer Fehler von 0,5 bis 5% bei 90%-iger Ausnutzung der ausgesandten β -Strahlung. Alle Meßergebnisse wurden in µmol C/mg Protein·min umgerechnet. Die verwendeten Isotopenpräparate wurden vom Radiochemical-Centre Amersham/England be-

zogen. Das Na-C_1-Acetat hatte die spezifische Aktivität von 57 mCi/mmol, das Na-C_2-Acetat von 58 mCi/mmol; das $NaH^{14}CO_3$ von 60 mCi/mmol.

7. Polarographische Sauerstoffbestimmung

Aus exponentiell photo-autotroph und -heterotroph gewachsenen Kulturen wurden Proben von ca. 20 ml Algensuspension entnommen, abzentrifugiert und durch Aufnehmen in ca. 10 ml luftgesättigten 0,01 m Phosphatpuffer (pH = 7,0), der 0,02 m KCl und 0,0025 m $MgCl_2$ enthielt, auf eine Dichte von $E_{\lambda 1000\ nm}$ = 1,3 eingestellt. Die polarographische Bestimmung der photosynthetischen Sauerstoffproduktion erfolgte anschließend bei einer Versuchstemperatur von 30° C und einer Beleuchtungsstärke von ca. 4 x 10^4 lux (Lichtquelle: 150 Watt-Lampe, Osram) mit dem Biological Oxygen Monitor (Model 53) der Firma YSI Co, Ohio/USA und einem mit dem Meßgerät gekoppelten und geeichten SERVOGOR-Schreiber. Die Berechnung der Absolutwerte erfolgte nach der Formel: S x P/760 x (1 - 0,0048 x K) ,wobei S = die Sauerstoffsättigung in luftgesättigtem Wasser in Abhängigkeit von der Temperatur bedeutet, die in mg O_2/l einer Tabelle von Truesdale et al. (1955) entnommen wurde, P = den in Ortshöhe tatsächlich vorhandenen Luftdruck (Torr) und K = den Salzgehalt der zu untersuchenden Algensuspension in g/l. Als Bezugsgröße diente der Chlorophyllgehalt pro ml Algensuspension.

8. Bestimmung von Enzymaktivitäten

Zur Messung von Enzymaktivitäten wurden exponentiell gewachsenen Kulturen ca. 20 ml Algensuspension entnommen und mit Nährlösung auf eine optische Dichte von $E_{\lambda 1000\ nm} = 1{,}3$ eingestellt. Zur Gewinnung zellfreier Extrakte wurden die Algen abzentrifugiert, in der jeweils benötigten Pufferlösung aufgenommen und in einer vorgekühlten Yeda-Presse (Yeda Scientific Instruments, Rehovot-Israel) mit einem Preßluftdruck von ca. 80 kp/cm^2 und langsamer Tropfgeschwindigkeit zweimal desintegriert. Der nach anschließendem scharfen Zentrifugieren gewonnene klare, enzymhaltige Überstand diente dann für alle Versuche. Im Falle der Bestimmung der Carboxydismutase-Aktivität wurde das desintegrierte Zellmaterial direkt verwendet. Die Aktivität der Isocitratlyase wurde in Anlehnung an Dixon und Kornberg (1959) bestimmt, die Aktivität der Carboxydismutase nach Russel and Gibbs (1966). Als Bezugsgröße diente stets der nach der Mikro-Kjeldahl-Methode ermittelte Proteingehalt.

9. Energiebedarf der lichtabhängigen Essigsäureaufnahme

Zur Bestimmung des Energiebedarfes der Acetatassimilation wurden bei den Wellenlängen λ 704 und 667 nm die von exponentiell photoheterotroph gewachsenen Algen absorbierten Photonen in Einstein gemessen. Hierzu wurden sehr dichte Zellsuspensionen von ca. 20 ml Volumen der untersuchten Stämme in die in Kap. II.5. beschriebene Anlage gebracht und die Aufnahme von 0,01 m Essigsäure im Licht und im Dunkeln bei den o.a.

Wellenlängen mehrmals über jeweils 5 bis 10 Minuten gemessen. Anschließend erfolgte die Messung der Energieabsorption durch die Zellsuspensionen nach der von French and Young (1956) angegebenen Methode mit Hilfe der Ulbrich'schen Kugel (French 1937). Zur Messung der Quantenstromdichte diente ein Großflächenbolometer (Fa. H. Röhrig, Berlin), das mit einem Galvanometer (Typ MG 1, Fa. Dr. Lange, Berlin) als Nullinstrument verbunden war (Warburg and Negelein 1928, Kok 1960, Wießner 1965). Zur Erzeugung des monochromatischen Lichtes wurden Interferenzlinien-Filter der Wellenlängen λ 704 und 667 nm verwendet, Fa. Schott und Gen., Mainz. Berechnet wurde der Quantenbedarf der Essigsäureassimilation in Einstein/mol Essigsäure.

10. Aufnahme von Absorptionsspektren

Algenproben von ca. 20 ml wurden scharf abzentrifugiert und nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem 0,025 m Phosphatpuffer (pH = 8,5) auf ein Volumen von 5 ml aufgefüllt. Anschließend wurde das Algenmaterial in einer vorgekühlten Yeda-Presse zweimal desintegriert (vgl. Kap. II.8.). Die auf diese Weise erhaltene Suspension von Zellfragmenten wurde ca. 10 Minuten lang zentrifugiert und der Niederschlag verworfen. Der tiefgrüne (und streuungsarme) Überstand von Chloroplastenpartikeln wurde mit dem o.a. Phosphatpuffer im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von λ 680 nm auf eine Extinktion = 0,2 eingestellt (Shimadzu, Double Beam Spectrophotometer, UV-200). Bei der Aufnahme von Differenzspektren wurden jeweils zwei

verschiedene Proben vergleichend parallel gemessen, die zuvor auf eine gleichgroße Absorption bei λ 680 nm eingestellt worden waren. Zur Aufzeichnung der Absorptionskurven im Wellenlängenbereich zwischen λ 730 und 610 nm diente ein an das Spektralphotometer angeschlossener Schreiber (Shimadzu, Recorder U-125).

11. Elektronenmikroskopische Methoden

Aus exponentiell wachsenden photo-autotrophen oder -heterotrophen Kulturen wurden ca. 20 ml Algen entnommen und in Anlehnung an Palade (1952) mit - in Chlamydobotrys-Nährlösung suspendiertem - 1%-igem OsO_4 fixiert. Alkoholentwässerung der Präparate, die eine zusätzliche Alkoholstufe enthielt und Eponeinbettung erfolgte nach Luft (1961). Die Ultradünnschnitte wurden mit 0,3%-igem Pb-Citrat nachkontrastiert (Reynolds 1963) und im Zeiss EM 9 untersucht.

III. Versuche und Ergebnisse

1. Vorbemerkung zu den Wachstumsversuchen

Voraussetzung für ein optimales Wachstum von Chlamydobotrys sind als Kohlenstoffquelle Essigsäure und als Energiequelle das Licht (Pringsheim und Pringsheim 1959). Im Vergleich zu anderen Grünalgenarten sind heterotrophes Wachstum und Vermehrung im Dunkeln nicht möglich (Pringsheim und Wießner 1960). Photoautotrophe Ernährungsbedingungen (Licht + CO_2) führen bei Chlamydobotrys - im Gegensatz zur Ernährung mit Acetat im Licht - nur zu einem schwachen Wachstum, wobei die Photosyntheseleistung dieses Organismus gegenüber anderen - unter gleichen autotrophen Bedingungen gewachsenen - Grünalgenarten nur sehr gering ist (Pringsheim und Wießner 1961). Daher war es zunächst von Interesse, das Wachstumsverhalten der verschiedenen Chlamydobotrys-Stämme unter autotrophen Ernährungsbedingungen zu untersuchen (Kap. III.2.) und diese Ergebnisse denen photoheterotroph gewachsener Stämme gegenüberzustellen (Kap. III.3. und .4.).

Unter Wachstum lebender Substanz versteht man die irreversible Substanzzunahme, die sich in der Regel unter Vergrößerung des Zellvolumens vollzieht und mit Zellteilungen verbunden ist. Zur Charakterisierung des Wachstumsverlaufes einer zellulären Algenkultur ist es daher notwendig, zwischen der eigentlichen Substanzzunahme, z.B. der Zunahme an Protein pro Zeiteinheit (Wachstumsrate) und der Vermehrungsfähigkeit

der Kultur pro Zeiteinheit (Teilungsrate) zu unterscheiden. Die Bestimmung nur einer dieser beiden Größen läßt keine Schlußfolgerungen auf die andere zu (Iggena 1938, Hoogenhout und Amesz 1965). In dieser Arbeit wurden daher stets sowohl die Substanzzunahme als auch die Vermehrungsfähigkeit zur Charakterisierung des Wachstumsverlaufes getrennt bestimmt. Ihre Berechnung erfolgte in Anlehnung an Schlegel (1969). Es wurden die folgenden Formeln verwendet:

1) Teilungsrate ν = Anzahl der Zellteilungen/Stunde

$$\nu = \frac{\log ZZ_2 - \log ZZ_1}{\log_n \cdot (t_2 - t_1)} \qquad (h^{-1})$$

n = Anzahl der Tochterzellen

ZZ_2 = Zellzahl zur Zeit t_2

2) Generationszeit g = Zeitintervall der Teilungsrate mit defekten, nicht teilungsfähigen und toten Zellen

$$g = \frac{1}{\nu} \qquad (h)$$

3) Wachstumsrate μ = Maß für die Geschwindigkeit des Zell= wachstums in der exponentiellen Phase

$$\mu = \frac{\log x_2 - \log x_1}{\log_e \cdot (t_2 - t_1)} \qquad (h^{-1})$$

x_2 = Proteinertrag oder Extinktionswert bei λ1ooo nm zur Zeit t_2

(5) Verdopplungszeit t_d = korrigierte Generationszeit, ermittelt aus dem Verdopplungsfaktor der Wachstumsraten

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \qquad (h)$$

(6) Verdopplungen /24 Stunden $d_{24} = \frac{24\ \mu}{\ln 2} \qquad (24\ h^{-1})$

2. Wachstumsverhalten während der photoautotrophen Kultur

Die untersuchten Chlamydobotrys-Stämme zeigen deutliche Unterschiede sowohl in ihrer Vermehrungsfähigkeit als auch in ihrem Wachstumsverhalten. Dabei stimmen das Verhalten von Teilungs- und Wachstumsraten in der Regel überein. Alle Stämme mit guter Teilungsrate haben hohe Wachstumsraten und umgekehrt (Tab. 1).

Bei der Berechnung der Teilungsraten wurden die Angaben von Pringsheim und Pringsheim (1959) zugrunde gelegt, daß bei der vegetativen Vermehrung von Chl. stellata mindestens vier Tochterzellen aus einer Mutterzelle hervorgehen können. Daß diese nur an Erdfaulkulturen ermittelte Zahl auch für die ernährungsphysiologischen Bedingungen dieser Arbeit zutrifft, wurde überprüft.

Für die Stämme C und I ist die Teilungsrate mit $\nu = 0{,}034$ und 0,037 gleich groß. Höhere Teilungsraten bei gleichzeitig höchster Wachstumsintensität wurden nicht gemessen (Tab. 1, Zeile 3 und 4). Die Stämme D und E haben geringere Teilungsraten ($\nu = 0{,}022$ und 0,026). Stamm H kann sich bei $\nu = 0{,}017$ und einer (mittleren) Generationszeit $g = 58{,}8$ Stunden am schlechtesten vermehren. Seine exponentielle Wachstumsphase endet nach ca. 65 Stunden bei einer Zellzahl von ca. 2×10^6 Zellen/ml (Abb. 1). Die Zellzahl der anderen Stämme liegt nach 65 Stunden bei 4 bis 5×10^6 Zellen/ml. Eine Besonder-

Tab. 1) Vergleich des Wachstumsverhaltens verschiedener Stämme von Chl. stellata bei photoautotropher Kultur

Stamm		C	D	E	H	I
1) Teilungsrate ν (h^{-1})		0,034	0,022	0,026	0,017	0,037
2) Generationszeit g (h)		29,4	45,5	38,4	58,8	27,0
3) Wachstumsrate μ (Trübung; h^{-1})		0,040	0,028	0,034	0,025	0,040
4) Wachstumsrate μ (Protein; h^{-1})		0,026	0,017	0,022	0,014	0,035
5) Verdopplungszeit t_d (Protein; h)		26,7	40,7	31,5	49,5	19,8
6) Verdopplungen/Tag d_{24} (Protein; 24 h^{-1})		0,90	0,58	0,76	0,48	1,21
7) KH/Protein		0,68	0,28	0,43	0,15	0,23
8) Protein/Zelle (x 10^{-4} γ)	von	0,86	0,78	1,59	1,30	5,37
	bis	0,62	0,66	0,92	0,93	3,77
9) Chl. a/b		4,11	4,72	4,14	3,08	5,26
10) Chl./Protein		0,040	0,048	0,049	0,033	0,032

heit ergibt sich für den Stamm I. Einerseits besitzt er eine mit Stamm C vergleichbare gute exponentielle Teilungsrate zum anderen hat er wie Stamm H am Ende des exponentiellen Wachstums eine sehr niedrige Zellzahl/ml, wobei die Teilungsrate von H nur halb so groß ist wie die des Stammes I. Berechnet man die theoretisch mögliche Zellzahl pro ml, die nach einer Kulturdauer von 24 Stunden erreicht werden kann, ausgehend von einer gemeinsamen Zellzahl während des exponentiellen Wachstums von 1,25 x 10^6 Zellen/ml (Abb. 1), und verwendet hierzu die ermittelten Teilungsraten, so ergeben sich die folgenden Zellzahlwerte: I = 4,30, C = 3,89, E = 2,98, D = 2,62, H = 2,20 x 10^6 Zellen/ml. Im Vergleich zur Ausgangszellzahl zeigen die Stämme C und I die höchsten Zuwachsraten bis zu 250%, während die Zellzahl von H nur um 80% zunimmt.

Als Maß für die Wachstumsrate wurden sowohl die Zunahme der Extinktion der Kulturen bei λ 1000 nm (= Trübung) als auch die Erhöhung des Proteingehaltes pro Zeiteinheit aus den Abb. 2 und 3 ermittelt. Beide Möglichkeiten zur Messung der Wachstumsleistung ergeben die gleichen relativen Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen (Tab. 1, Zeile 3 und 4) und lassen beide Aussagen über deren Wachstumsraten zu.

Photoautotrophe Ernährung führt in der exponentiellen Wachstumsphase bei Stamm C und I zu einer aus der Trübungszunahme errechneten Wachstumsrate von μ = 0,040; für E errechnet sich eine etwas geringere Wachstumsrate μ = 0,034. Für D und H

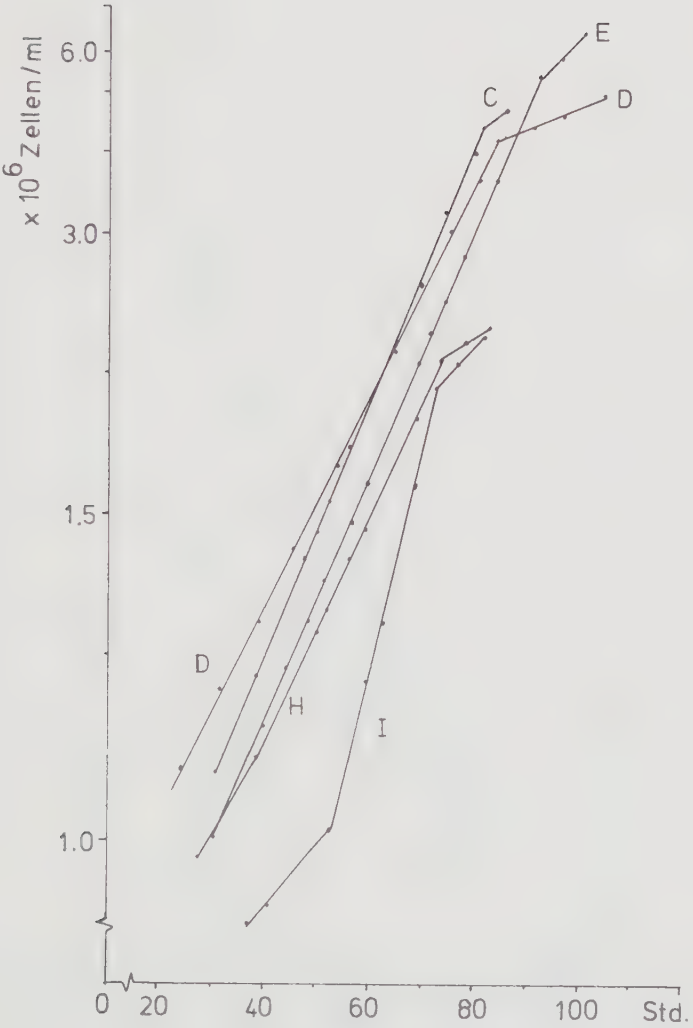


Abb. 1) Veränderung der Zellzahl bei verschiedenen Stämmen von Chl. stellata während der photoautotrophen Kultur. Zellzahl zu Kulturbeginn (= 0 Std.) zwischen 0,6 x 10^4 und 1,5 x 10^4 Zellen/ml.

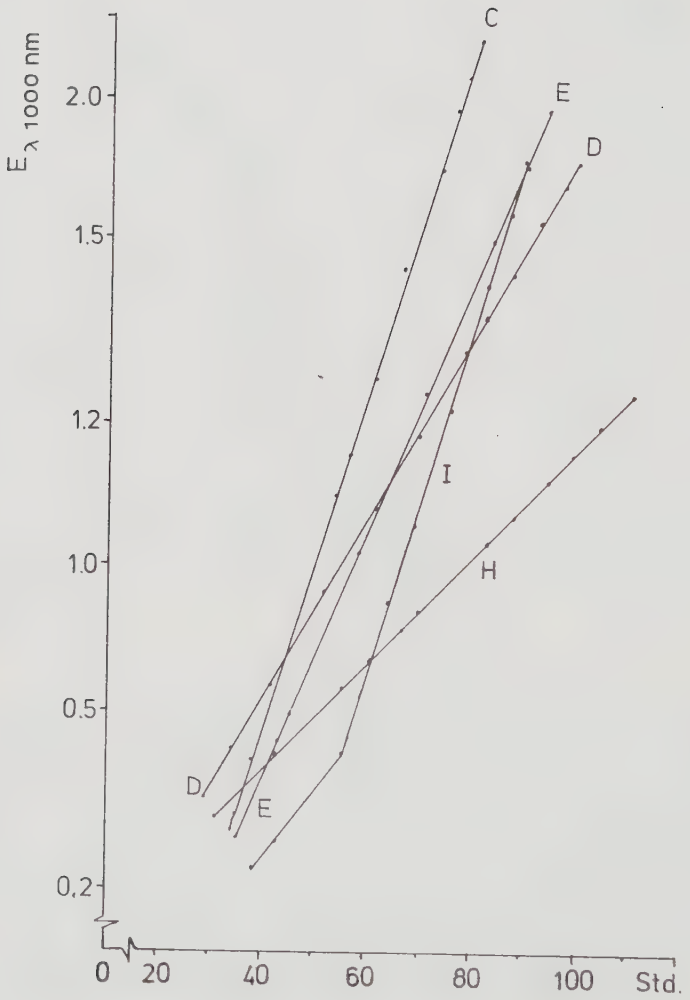


Abb. 2) Zunahme der optischen Dichte ($E_{\lambda 1000\ nm}$) bei verschiedenen Stämmen von Chl. stellata während der photoautotrophen Kultur

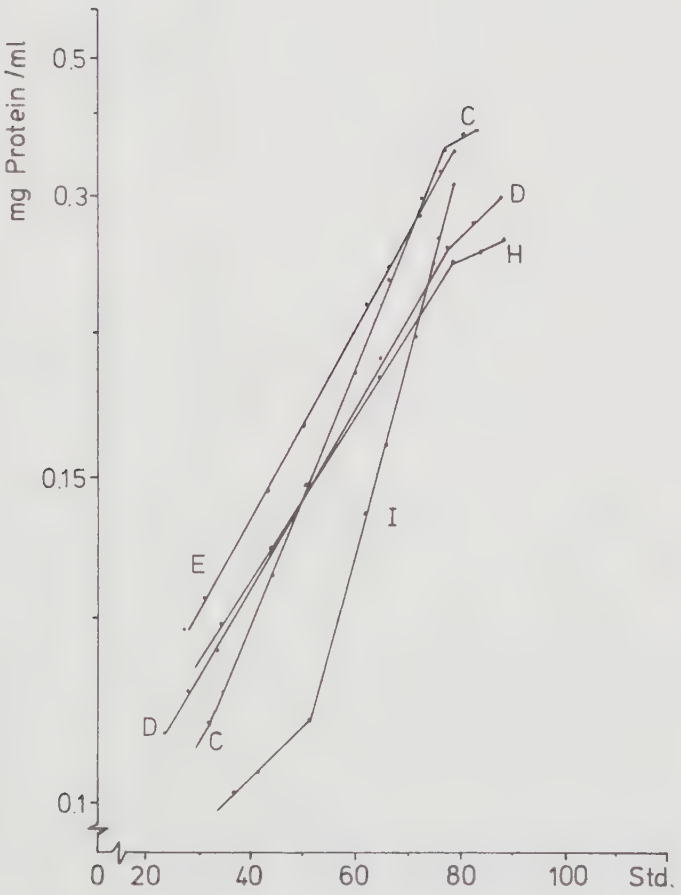


Abb. 3) Proteingehalt von verschiedenen Chlamydobotrys-Stämmen während der photoautotrophen Kultur

liegen die Wachstumsraten mit μ = 0,028 und 0,025 rund 40% unter denen der Stämme C und I.

Die Chlamydobotrys-Stämme C und I zeigen auch durch ihre Zunahme des Proteingehaltes während photoautotropher Kultur (Abb. 3) hohe Wachstumsleistungen. Beim Stamm I führt photoautotrophe Ernährung zur höchsten Stickstoffzunahme (μ = 0,035). Stamm C zeigt mit μ = 0,026 eine mit Stamm E übereinstimmende Wachstumsrate (μ = 0,022), während H den geringsten Zuwachs im Protein hat (μ = 0,014). Errechnet man die Substanzzunahme nach 24 Stunden (Verdopplungen/Tag, d_{24}) aus den durch Zunahme des Proteins zu ermittelnden Wachstumsraten, so wird ebenfalls deutlich, daß Stamm I fast dreimal so ertragreich ist wie H (Tab. 1, Zeile 6).

Zur weiteren Charakterisierung des Wachstumsverhaltens der Chlamydobotrys-Stämme wurde das Verhältnis des Kohlenhydratgehaltes (KH) zum Proteingehalt der Algen herangezogen. Nach allgemeiner Auffassung soll dieses Verhältnis während des exponentiellen Wachstums im Minimum sein und soll andererseits ein hohes Kohlenhydrat/Proteinverhältnis der Algen auf ein mangelhaftes Wachstum hindeuten. Nach Abb. 4) ist vorallem bemerkenswert, daß Stamm H unter photoautotrophen Ernährungsbedingungen als einziger Chlamydobotrys-Stamm während des Kulturverlaufs nur eine sehr geringe Kohlenhydratspeicherung zeigt und während des gesamten Wachstums einen sehr niedrigen, konstanten KH-Spiegel um 0,025 mg/ml beibehält. Daher ist das Verhältnis der geringen Kohlenhy-

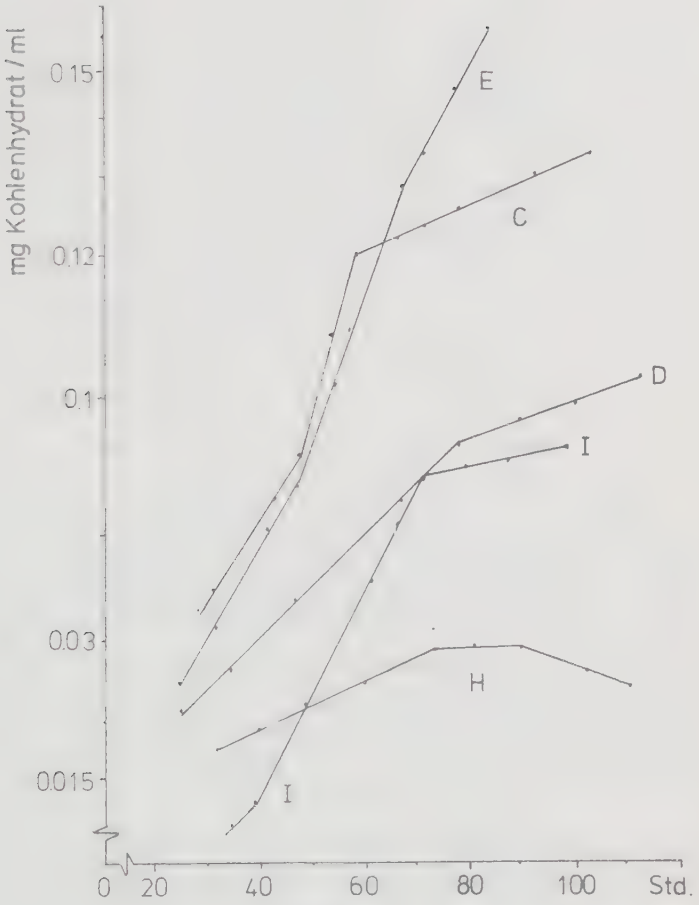


Abb. 4) Kohlenhydratgehalt von verschiedenen Chlamydo=botrys-Stämmen während der photoautotrophen Kultur

dratmenge zum Proteingehalt für H sehr günstig und hebt ihn gegenüber den anderen Stämmen deutlich ab (Tab. 1, Zeile 7). Ungeachtet der starken Zunahme an Kohlenhydraten (bis zu 360%) während des exponentiellen Wachstums haben D und I wegen ihres vergleichbar hohen Proteingehaltes mit 0,28 und 0,23 günstige KH/Proteinquotienten; Stamm C hat hingegen mit 0,68 das schlechteste KH/Proteinverhältnis. Nach diesen Ergebnissen ist festzustellen, daß zur Charakterisierung der Wachstumsleistung von Chlamydobotrys-Stämmen das Kohlen= hydrat/Proteinverhältnis mit den Teilungs- bzw. Wachstums= raten eindeutig nicht übereinstimmt.

Der Proteingehalt pro Zelle fällt bemerkenswerterweise bei autotroph ernährten Algen mit Zunahme der Zellzahl während des exponentiellen Wachstums fortlaufend ab (Tab. 1, Zeile 8) Am Anfang besitzt I den höchsten Stickstoffgehalt pro Zelle, anschließend sinkt er bei diesem Stamm jedoch am extremsten . Die Stämme E und H haben einen um ca. 70% niedrigeren, die Stämme C und D mit ca. 0,73 x 10^{-4} γ Protein den gering= sten Proteingehalt/Zelle. Diese analytischen Daten bestä= tigen einerseits die mikroskopische Beobachtung, daß die Chlamydobotrys-Stämme E,H und I sich durch besonders große Zellen auszeichnen (mittlerer Ø ca. 13,0 ± 3,0 µ). Anderer= seits wird aus der Beziehung des Proteingehaltes zur Zell= zahl/ml die Gegenläufigkeit von Wachstum und Vermehrung für Stamm I deutlich, der zwar hohe Wachstums- und Teilungsraten aber insgesamt nur wenige Zellen/ml bei autotropher Kultur hat.

sichtlich ihres Chlorophyllgehaltes - bezogen auf Protein - stimmen die Chlamydobotrys-Stämme C,D und E in der exponentiellen Wachstumsphase überein. Das gleiche trifft für das Chlorophyll a/b-Verhältnis zu, gemessen bei einer optischen Dichte der Kulturen von $E_{1000\ nm} = 1{,}0$ (Tab. 1, Zeile 9 und 10). Die Stämme H und I haben ein geringeres Chl./Protein-Verhältnis, Stamm I einen niedrigeren Chlorophyll-b-Anteil am Gesamtchlorophyll.

2. a) Zusammenfassung

1) Als Maß für das Wachstum verschiedener Stämme von Chl. stellata wurden nach standardisierten Formeln die Wachstums- und Teilungsraten ermittelt und zusätzlich das Kohlenhydrat/Proteinverhältnis sowie der Proteingehalt pro Zelle bestimmt.

2) Unter einheitlichen photoautotrophen Ernährungsbedingungen zeigen die untersuchten Stämme C,D,E,H und I während des exponentiellen Wachstums deutliche Unterschiede ihres Wachstumsverhaltens.

3) Die Höhe der Wachstumsraten und der Teilungsraten verhalten sich in der Regel parallel.

4) Die aus den Teilungsraten errechnete (mittlere) Generationszeit ist bei allen Stämmen unverhältnismäßig lang. Sie wird aber größenordnungsmäßig aus der ermittelten Verdopplungszeit der Proteinzunahme bestätigt (Tab. 1, Zeile 2 u. 5).

5) Aufgrund der Teilungsraten bzw. Generations- und Verdopplungszeiten ergibt sich für die Stämme C und I die beste,

für Stamm H die schlechteste Wachstumsleistung.

6) Das Kohlenhydrat/Proteinverhältnis während der exponentiellen Wachstumsphase ist bei den verschiedenen Stämmen sehr unterschiedlich. Am niedrigsten bei H, am höchsten bei Stamm C.

7) Der Proteingehalt pro Zelle während des exponentiellen Wachstums ist am höchsten bei Stamm I. Zusammen mit E und H besitzt dieser Chlamydobotrys-Stamm während Autotrophie meistens sehr große Zellen.

8) Der Chlorophyll/Proteingehalt liegt bei C,D und E gleich hoch, niedriger bei H und I.

9) Eine Ordnung der photoautotroph gewachsenen Chlamydobotrys-Stämme nach abnehmender Vermehrungs- und Wachstumsleistung ergibt die folgende Reihenfolge: I,C,E,D,H.

3. Wachstumsverhalten während der photoheterotrophen Kultur

Unter photoheterotrophen Ernährungsbedingungen ergeben sich wie bei Autotrophie deutliche Unterschiede zwischen den untersuchten Chlamydobotrys-Stämmen sowohl in ihrer Vermehrungs- als auch ihrer Wachstumsleistung. Verglichen mit photoautotropher Ernährung führt die Photoheterotrophie ganz allgemein bei allen Stämmen zu höheren Teilungs- und Wachstumsraten.

Die Stämme E und H wachsen mit einer (mittleren) Generationszeit von 15 bis 16 Stunden am schnellsten und stimmen in ihren Teilungsraten überein $\nu = 0{,}063$ und 0,066 (Tab. 2, Zeile 2 und 1). Stamm I hat eine etwas geringere ($\nu = 0{,}058$), die Stämme C und D mit $\nu = 0{,}046$ und 0,045 die niedrigste Teilungsrate. Nach ca. 45 Kulturstunden haben alle Stämme mit Ausnahme von D die späte exponentielle Wachstumsphase mit einer Zellzahl von ca. 3 bis 4 x 10^6 Zellen/ml erreicht. Stamm D hat eine ca. 10 Stunden längere exponentielle Wachstumsphase, die mit ca. 2 x 10^6 Zellen/ml endet (Abb. 5). Geht man davon aus, daß alle Stämme während des exponentiellen Wachstums eine Zellzahl von 1,25 x 10^6 Zellen pro ml erreicht haben und errechnet man unter Verwendung der ermittelten Teilungsraten die theoretisch mögliche Zunahme der Zellzahl nach 24 Stunden, so ergeben sich die folgenden Zellzahlwerte: C = 5,81, D = 5,62, E = 10,24, H = 11,32 und I = 8,67 x 10^6 Zellen/ml. Die Zuwachsrate ist demnach bei den

Tab. 2) Vergleich des Wachstumsverhaltens verschiedener Stämme von Chl. stellata bei photoheterotropher Kultur

Stamm	C	D	E	H	I
1) Teilungsrate ν (h^{-1})	0,046	0,045	0,063	0,066	0,058
2) Generationszeit g (h)	21,7	22,2	15,9	15,2	18,2
3) Wachstumsrate μ (Trübung; h^{-1})	0,067	0,063	0,090	0,088	0,080
4) Wachstumsrate μ (Protein; h^{-1})	0,049	0,042	0,079	0,073	0,066
5) Verdopplungszeit t_d (Protein; h)	14,1	16,5	8,8	9,5	10,5
6) Verdopplungen/Tag d_{24} (Protein; 24 h^{-1})	1,70	1,45	2,74	2,53	2,29
7) KH/Protein	0,30	0,18	0,30	0,23	0,26
8) Protein/Zelle (x 10^{-4} γ) von	1,14	2,42	2,00	1,98	5,80
bis	1,17	1,70	1,46	1,80	2,90
9) Chl. a/b	5,24	5,26	6,00	7,32	7,84
10) Chl./Protein	0,042	0,037	0,042	0,042	0,039

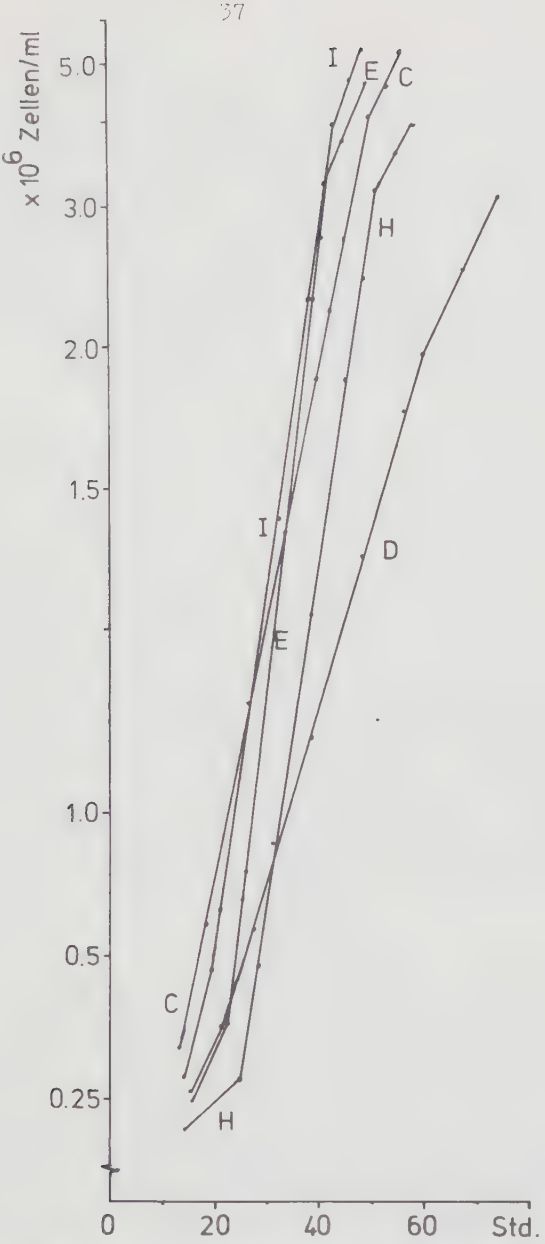


Abb. 5) Veränderung der Zellzahl bei verschiedenen Stämmen von Chl. stellata während der photoheterotrophen Kultur. Zellzahl zu Kulturbeginn s. Abb. 1)

Stämmen E und H mit rund 800% doppelt so hoch wie die der Stämme C und D (400%) gegenüber der Ausgangszellzahl. Aufgrund dieser Werte, wie auch aus den ermittelten Teilungsraten wird deutlich, daß sich die untersuchten Chlamydobotrys-Stämme H und D in ihrer photoheterotrophen Vermehrungsfähigkeit am extremsten unterscheiden: H wächst und teilt sich am schnellsten, D am schlechtesten.

Aus der Zunahme der Trübung und des Proteingehaltes pro Zeiteinheit während der photoheterotrophen Kultur ergeben sich die aus Abb. 6 und 7) errechneten und in Tab. 2, Zeile 3 und 4) dargestellten Wachstumsraten. Generell sind die Wachstumsraten aller Stämme unter Photoheterotrophie höher als bei autotropher Ernährung. Bei den Stämmen E und H führt photoheterotrophes Wachstum zu den höchsten Wachstumsraten von μ = 0,090 und 0,088, errechnet aus der Trübungszunahme. Für Stamm I liegt die Wachstumsrate mit μ = 0,080 etwas niedriger, bei den Stämmen C und D mit μ = 0,067 und 0,063 rund 30% unter denen von E und H.

Bei der als Zunahme des Proteins/Zeit ermittelten Wachstumsleistung zeigen die Stämme C und D mit μ = 0,049 und 0,042 rund 90% niedrigere Werte als E und H (μ = 0,079 und 0,073). Bestimmt man die Verdopplungsraten der Substanzzunahme pro Tag (d_{24}) aus dem Proteingehalt der Kulturen, so ist Stamm E fast zweimal ertragreicher als D (Tab. 2, Zeile 6).

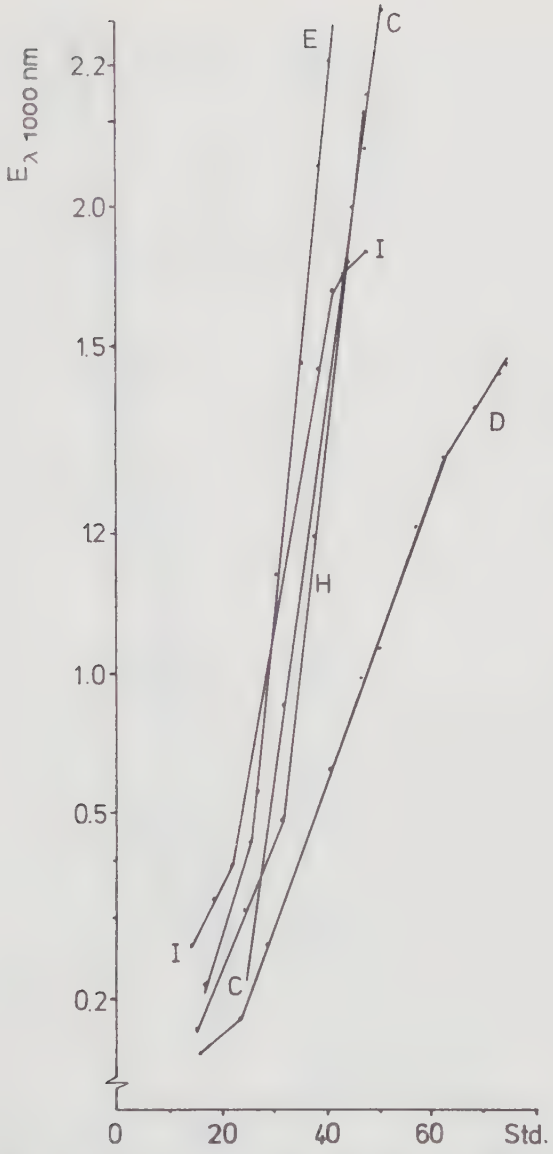


Abb. 6) Zunahme der optischen Dichte ($E_{\lambda\ 1000\ nm}$) bei verschiedenen Stämmen von Chl. stellata während der photoheterotrophen Kultur

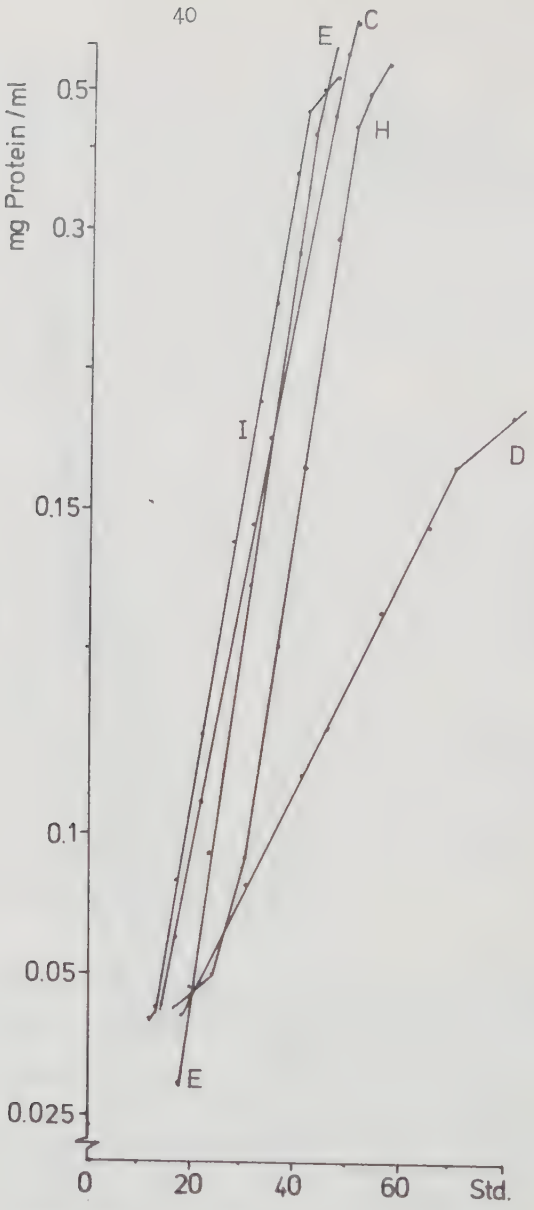


Abb. 7) Proteingehalt von verschiedenen Chlamydo= botrys-Stämmen während der photoheterotrophen Kultur

Alle untersuchten Chlamydobotrys-Stämme zeigen bei photoheterotropher Ernährung eine deutliche Zunahme des Kohlenhydratgehaltes während ihrer Kultur (Abb. 8). Sie ist am höchsten bei den Stämmen C,E und I, bei Stamm D am niedrigsten. Das Kohlenhydrat/Proteinverhältnis während des exponentiellen Wachstums ist daher für Stamm D mit 0,18 am günstigsten (Tab. 2, Zeile 7). H und I folgen mit 0,23 und 0,26, während die Stämme C und E das höchste KH/Proteinverhältnis haben (0,30). Insgesamt sind jedoch bei photoheterotropher Kultur im Verhältnis Kohlenhydrat/Protein nicht ebenso drastische Unterschiede zwischen den Stämmen wie unter photoautotrophen Ernährungsbedingungen festzustellen.

Der pro Zelle berechnete Proteingehalt während des exponentiellen Wachstums ist für die überprüften Stämme in Tab. 2, Zeile 8 wiedergegeben. Bei den meisten Stämmen sinkt er während des Wachstums mit zunehmender Zellzahl ab. Stamm C hingegen zeigt eine deutliche, wenn auch geringe Zunahme des zellulären Stickstoffgehaltes. I hat von allen Stämmen - wie unter photoautotrophen Ernährungsbedingungen - den meisten organisch gebundenen Stickstoff pro Zelle, der am Ende der exponentiellen Wachstumsphase auf die Hälfte abgesunken ist. Verglichen mit I liegt der Anfangs-Proteingehalt/Zelle bei Stamm D,E und H bis zu 70% niedriger, sinkt hier jedoch im Laufe des Wachstums maximal nur um 30% ab (D und E).

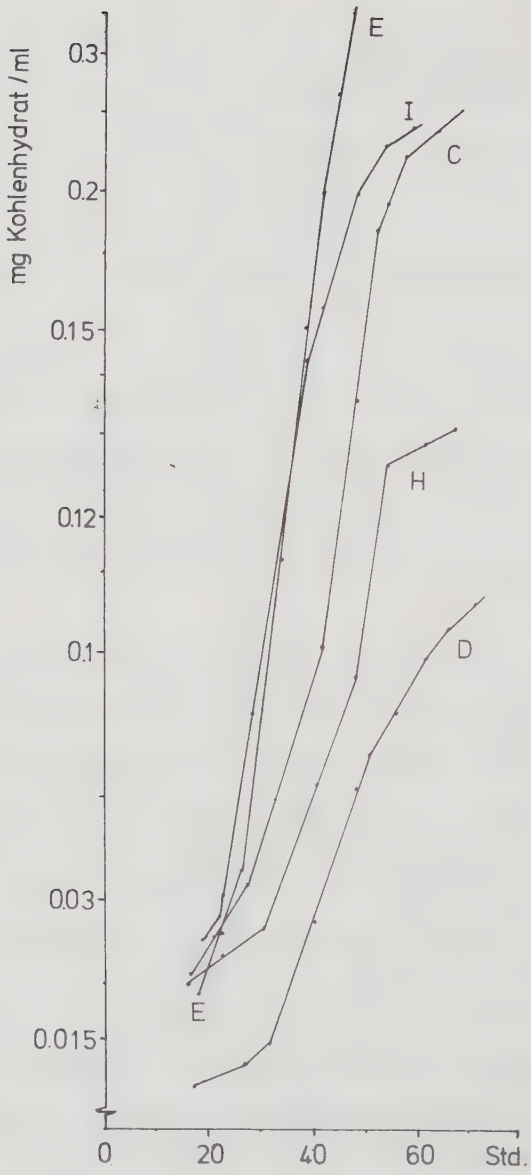


Abb. 8) Kohlenhydratgehalt von verschiedenen Chlamydobotrys-Stämmen während der photohetero= trophen Kultur

Wie unter autotrophen, so besitzen die Chlamydobotrys-Stämme E,H und I auch bei photoheterotropher Kultur besonders große Zellen mit einem mittleren Ø von 13,0 ± 3,0 µ . Dies stimmt mit dem bei dieser Stämmen errechneten hohen Protein=gehalt/Zelle überein. Stamm C und D haben jedoch auch bei Photoheterotrophie auffallend kleine Zellen (mittlerer Ø = 9,0 ± 3,0 µ), die außerdem noch durch den geringsten zellu=laren Proteingehalt (Stamm C) und die schlechtesten Teilungs=raten sowie die niedrigste Zahl/ml (Stamm D) charakte=risiert werden.

Eine Verfolgung des Gesamtchlorophyll/Protein-Verhältnisses während der exponentiellen photoheterotrophen Wachstums=phase zeigt im Gegensatz zum Verhalten bei autotropher Kultur keine auffallenden Unterschiede zwischen den Stämmen von Chl. stellata (Tab. 2, Zeile 10). Anders hingegen das Chlorophyll a/b-Verhältnis, für das sich deutliche Unter=schiede nachweisen lassen. Die Stämme C und D haben mit 5,24 und 5,26 den höchsten Chlorophyll-b Anteil am Gesamtchloro=phyll; die Stämme H und I mit 7,32 und 7,84 den niedrigsten Chlorophyll-b-Gehalt.

3. a) Zusammenfassung

1) Unter einheitlichen photoheterotrophen Ernährungsbedingungen ergeben sich im Wachstumsverhalten und in der Vermehrungsfähigkeit deutliche Unterschiede zwischen den überprüften Chlamydobotrys-Stämmen, wobei in der Regel hohe Wachstumsraten mit hohen Teilungsraten einhergehen.

2) Aufgrund ihrer höheren Wachstumsraten bzw. kürzeren Generations- und Verdopplungszeiten wachsen die Stämme E,H und I schneller als C und D.

3) Das Kohlenhydrat/Proteinverhältnis ist bei allen Stämmen ungefähr gleich groß.

4) Der pro Zelle berechnete Proteingehalt ist zu Beginn des exponentiellen Wachstums am höchsten bei Stamm I, am niedrigsten bei Stamm C. In der späten exponentiellen Wachstumsphase fällt er bei den meisten Stämmen, am extremsten bei I, ab. Beim Stamm C steigt er während des exponentiellen Wachstums fortlaufend an.

5) In ihrem auf das Protein bezogenen Chlorophyllgehalt unterscheiden sich die Chlamydobotrys-Stämme nur geringfügig voneinander. Das Chlorophyll a/b-Verhältnis von H und I ist groß, das von C und D am kleinsten.

6) Die vorliegenden Ergebnisse weisen die Stämme E und H innerhalb der Artengruppe Chl. stellata als Vertreter guten photoheterotrophen Wachstums aus, während C und D am schlechtesten wachsen und sich vermehren. Wenn man die Chlamydobotrys-Stämme nach abnehmender Wachstums- und Vermehrungsleistung in einer Reihe ordnet, nimmt Stamm E in der Rang-

folge die erste, Stamm D die letzte Stellung ein: E,H,I,C,D .

4. Vergleich des Wachstumsverhaltens unter photoautotrophen und photoheterotrophen Ernährungsbedingungen

In den vorangegangenen Kapiteln wurde dargestellt, daß - photoheterotroph ernährt (Licht + Acetat) - alle untersuchten Stämme von Chl. stellata in der Regel weitaus besser wachsen und sich schneller vermehren als unter photoautotrophen Ernährungsbedingungen (Licht + CO_2); vgl. die Zusammenfassung der Tabellen 1 und 2 in Tab. 3. Dies zeigt sich besonders deutlich in der Trübungszunahme und im Proteingehalt der Kulturen, wobei allerdings die Förderung der Wachstums= leistung durch Acetat bei den verschiedenen Stämmen unter= schiedlich ist (Abb. 9). Der photoautotroph gut wachsende Stamm C wird durch Acetaternährung nur um 80% gefördert, während bei H die Wachstumsleistungen gegenüber Autotrophie um 340% zunehmen. Dieses unterschiedliche Ausmaß der Wachs= tumsförderung durch Acetat findet für die einzelnen Stämme eine deutliche Parallele in den verschieden langen Anpas= sungszeiten an photoheterotrophe Ernährungsbedingungen beim Übergang von der Autotrophie zur Photoheterotrophie (Kap. III. 7).

Die Verdopplungszeit (t_d), d.h. das Zeitintervall, in dem die Zellsubstanz (Protein) um 100% zunimmt, ist bei photo= autotropher Kultur von Chlamydobotrys mit durchschnittlich 33,6 Stunden unverhältnismäßig lang und unter Photohetero=

trophie mit durchschnittlich t_d = 11,9 Stunden deutlich niedriger. Die (mittlere) Generationszeit g ist um die Hälfte kürzer (39,8 gegenüber 18,6 Stunden). Allerdings liegt bei photoheterotroph ernährten Algen die am Ende der exponentiellen Wachstumsphase erreichte Zellzahl pro ml um rund 20% unter der bei Autotrophie erzielten Zahl (vgl. Abb. 1 und Abb. 5). Es ist möglich, daß - bedingt durch die relativ kurzen Generations- bzw. Verdopplungszeiten - viele Zellen in den mit Acetat ernährten Kulturen eher sterben als unter autotrophen Bedingungen und daher die Zellzahl/ml bei photoheterotropher Kultur, trotz hoher Teilungsraten, niedriger bleibt als bei den sich langsamer teilenden photoautotroph ernährten Algen.

Unterschiede zwischen den Stämmen treten ebenfalls bei der biochemischen Zusammensetzung der photoautotroph bzw. photoheterotroph ernährten Zellen von Chlamydobotrys auf: Kohlenhydrat, Protein, Pigmente. Auffallenderweise ist das KH/Proteinverhältnis dabei weniger von den Ernährungsbedingungen bedingt - im Gegensatz zu der im vorigen Abschnitt geschilderten Zellzahlentwicklung und der durch Acetat geförderten Wachstumsleistungen - als vielmehr stammspezifisch.
So treten im KH/Proteinverhältnis zwischen den Stämmen bei Ernährung mit Acetat ungefähr die gleichen Unterschiede wie bei Autotrophie auf, wobei das Verhältnis bei Photoheterotrophie mit durchschnittlich 0,25 um 30% günstiger als bei autotroph ernährten Algen (0,35) liegt. Beim Stamm H ist die während photoautotropher Kultur gezeigte Hemmung der

Tab. 3) Vergleich der Wachstumsleistungen verschiedener Stämme von Chl. stellata bei photoautotropher (Licht + CO_2) und bei photoheterotropher Kultur (Licht + Acetat)

Stamm		C	D	E	H	I
1) Teilungsrate ν (h^{-1})	CO_2	0,034	0,022	0,026	0,017	0,037
	Acetat	0,046	0,045	0,063	0,066	0,058
2) Generationszeit g (h)	CO_2	29,4	45,5	38,4	58,8	27,0
	Acetat	21,7	22,2	15,9	15,2	18,2
3) Wachstumsrate μ (Trübung; h^{-1})	CO_2	0,040	0,028	0,034	0,025	0,040
	Acetat	0,067	0,063	0,090	0,088	0,080
4) Wachstumsrate μ (Protein; h^{-1})	CO_2	0,026	0,017	0,022	0,014	0,035
	Acetat	0,049	0,042	0,079	0,073	0,066
5) Verdopplungszeit t_d (Protein; h)	CO_2	26,7	40,7	31,5	49,5	19,8
	Acetat	14,1	16,5	8,8	9,5	10,5
6) Verdopplungen/Tag d_{24} (Protein; 24 h^{-1})	CO_2	0,90	0,58	0,76	0,48	1,21
	Acetat	1,70	1,45	2,74	2,53	2,29
7) KH/Protein	CO_2	0,68	0,28	0,43	0,15	0,23
	Acetat	0,30	0,18	0,30	0,23	0,26
8) Protein/Zelle (x 10^{-4} γ) von	CO_2	0,86	0,78	1,59	1,30	5,37
bis		0,62	0,66	0,92	0,93	3,77
von	Acetat	1,14	2,42	2,00	1,98	5,80
bis		1,17	1,70	1,46	1,80	2,90
9) Chl. a/b	CO_2	4,11	4,72	4,14	3,08	5,26
	Acetat	5,24	5,26	6,00	7,32	7,84
10) Chl./Protein	CO_2	0,040	0,048	0,049	0,033	0,032
	Acetat	0,042	0,037	0,042	0,042	0,039

Kohlenhydratspeicherung bei Ernährung mit Acetat nicht vorhanden; daher nimmt sein KH/Proteinverhältnis um 50% zu.

Der Proteingehalt pro Zelle ist bei den mit Acetat ernährten Algen, mit Ausnahme von Stamm I, höher als unter autotrophen Bedingungen. Den stärksten Unterschied im Proteingehalt/Zelle, verglichen mit dem bei Autotrophie (autotroph ernährte Zelle = 100%), zeigt Stamm D mit 200%, gefolgt von H = 50%, E = 40%, C = 30% und I = 10%. Dabei ist bemerkenswert, daß die Zellgröße der überprüften Stämme (= mittlerer Ø) von den Ernährungsbedingungen nur unwesentlich verändert werden kann, wofür auch die maximal mögliche Erhöhung des Proteins/Zelle um nur 50% beim photoheterotroph kultivierten Stamm H spricht, der - wie E und I - durchschnittlich 13,0 µ große Zellen besitzt. Stamm D kann hingegen in den ± kleinen Zellen seinen Proteingehalt pro Acetat ernährte Zelle gegenüber Autotrophie um 200% steigern, während bei C der Proteingehalt bei ± unverändert kleinen Zellen fast gleich bleibt.

Die Werte für das Gesamtchlorophyll - bezogen auf Protein - zeigen bei einem Wechsel in der Ernährungsart keine drastischen Veränderungen gegenüber Autotrophie. Lediglich beim Stamm D senkt Acetaternährung den Chlorophyllanteil um 23%. Das Chlorophyll a/b-Verhältnis ist unter Photoheterotrophie bei allen Chlamydobotrys-Stämmen gegenüber Autotrophie erhöht; bei H um 140%, bei Stamm D nur um 10%.

Die aus den bisherigen Versuchen ermittelten Ergebnisse zum Wachstumsverhalten der Chlamydobotrys-Stämme in Abhängigkeit von den Ernährungsbedingungen sind in der folgenden Tabelle nochmals zusammengefaßt worden:

Stamm	C	D	E	H	I
CO_2	++	+	+	-	++
Acetat	-	-	++	++	+

++ = sehr gutes Wachstum
+ = gutes "
- = schlechtes "

Im Vergleich dieser Tabelle mit der Abb. 9) wird deutlich, daß im Wachstumsverhalten zwischen den Stämmen sowohl Unterschiede bei photoautotropher als auch bei photoheterotropher Ernährung bestehen. Aufgrund dieser Differenzierungen lassen sich die Stämme nach ihrer abnehmenden photo-heterotrophen bzw. nach ihrer zunehmenden -autotrophen Wachstumsleistung wie folgt anordnen: E,H,I,C,D. Daraus können innerhalb der Sammelart von Chl. stellata zwei wachstumsphysiologisch verschiedene Gruppen abgeleitet werden: E und H als deutliche Vetreter der photoheterotrophen Gruppe, sowie Stamm C und D als Vetreter der photoautotrophen Gruppe. Der Stamm I nimmt nach dieser Einteilung eine Zwischenstellung ein.

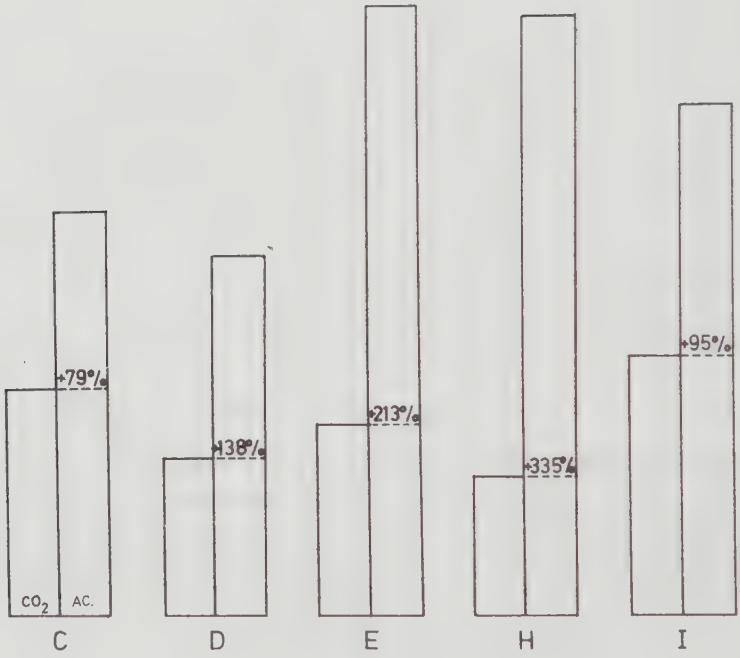


Abb. 9) **Vergleich der Wachstumsleistungen** (= Zunahme des Proteingehaltes und der Extinktion bei λ 1ooo nm) ver= schiedener Stämme von Chl. stellata bei photoautotropher (CO_2) und bei photoheterotropher Kultur (Acetat)

5. Die stoffwechselphysiologischen Leistungen in Abhängigkeit von den Ernährungsbedingungen

Im Anschluß an die im vorangegangenen Kapitel vorgenommene wachstumsphysiologische Charakterisierung der verschiedenen Chlamydobotrys-Stämme soll nun die Frage gestellt werden, ob die beobachteten unterschiedlichen Wachstumsleistungen konstante Merkmale für jeden einzelnen Stamm sind und auf stammspezifischen stoffwechselphysiologischen Unterschieden in der Fähigkeit zur Verwendung verschiedener C-Quellen beruhen, oder ob sie etwa nur von den gewählten Kulturbedingungen abhängen. Die in dieser Arbeit für alle untersuchten Stämme verwendeten Kulturmethoden und -medien waren jedoch stets identisch und unterscheiden sich ausschließlich in der Art der während des Wachstums gebotenen C-Quelle (CO_2 oder Acetat). Es ist daher zu vermuten, daß die Differenzierungen im Wachstumsverhalten der Stämme auf unterschiedliche stammspezifische Fähigkeiten zur Verwertung der beiden Kohlenstoffquellen zurückgehen, denn photoautotroph schlecht wachsende Algen werden durch Acetat am meisten gefördert (Beispiel: H); andererseits wächst C photoheterotroph am schlechtesten, autotroph kultiviert jedoch am besten. Diese Möglichkeit stammspezifischer Unterschiede in der physiologischen Fähigkeit zum Wachstum mit der jeweils gebotenen C-Quelle soll daher durch solche Experimente geprüft werden, durch die sich charakteristische, physiologisch-photoheterotrophe bzw. -autotrophe Merkmale

für die einzelnen Stämme nachweisen lassen. So wurde z.B. geprüft, ob die Ursache für das gute Wachstum der Stämme C und I während Autotrophie eine diese Algen von den übrigen Chlamydobotrys-Stämmen abhebende, besonders gute Fähigkeit zur Photosynthese ist bzw. vice versa, und ob z.B. bei den photoheterotroph gut wachsenden Stämmen E und H eine besonders gute Leistungsfähigkeit zur Acetatassimilation vorliegt.

5. a) Die Photosyntheseleistung

Die Photosyntheseleistungen während des exponentiellen autotrophen Wachstums sind als CO_2-Einbauraten in Tab. 4) und als O_2-Entwicklung in Tab. 5) dargestellt. Alle Stämme verhalten sich hinsichtlich ihrer CO_2-Fixierungsraten im Licht parallel zu ihren photoautotrophen Wachstumsleistungen (vgl. Tab. 1). Die Stämme C und I haben mit 40,9 und 42,9 x 10^{-3} µMol aus Na-Hydrogenkarbonat eingebautem Kohlenstoff (bezogen auf den Proteingehalt) identische und die höchsten CO_2-Einbauraten; D und E stimmen in ihren Leistungen ebenfalls überein. Ihre Leistung liegt um ca. 30% unter der des Stammes I. Stamm H hat mit 15,0 x 10^{-3} µMol Kohlenstoff die geringste Photosyntheseleistung (ca. 65% unter der von C und I).

Da bei $^{14}CO_2$-Einbauversuchen nachgewiesen werden muß, daß der Einbau tatsächlich auf einer photosynthetischen Fixierung von Kohlendioxid beruht, wurden die Versuche auch in Gegenwart des Photosynthesegiftes DCMU (3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylurea; Endkonzentration: 5 x 10^{-5} M) durchgeführt (Abb. 10). Die Versuche beweisen, daß die beobachtete lichtabhängige $^{14}CO_2$-Fixierung tatsächlich auf die Photosynthese zurückgeht, denn DCMU senkt bei allen Stämmen den CO_2-Einbau um ca. 90% auf den Wert der Dunkelfixierung.

Wird bei photoheterotroph gewachsenen Chlamydobotrys-Stämmen die Photosyntheseleistung als CO_2-Einbau gemessen, so ist

	x 10^{-3} µMol C/mg Protein·min				
Stamm	C	D	E	H	I
Licht	40,9	29,1	27,4	15,0	42,9

Tab. 4) Einbau von ^{14}C aus $NaH^{14}CO_3$ in zelleigene Verbindungen im Licht während des exponentiellen Wachstums photoautotroph kultivierter Stämme von Chl. stellata. Beleuchtungsstärke = 10^4 lux, Versuchstemperatur = 30° C, Extinktion der Algensuspensionen bei λ 1ooo nm = 1,3

	x 10^{-3} µl O_2 / µg Chlorophyll·min				
Stamm	C	D	E	H	I
Licht	28,1	22,6	21,4	19,1	21,7

Tab. 5) Photosynthetische O_2-Entwicklung während des exponentiellen Wachstums photoautotroph kultivierter Stämme von Chl. stellata. Beleuchtungsstärke = 4 x 10^4 lux, sonstige Angaben wie oben

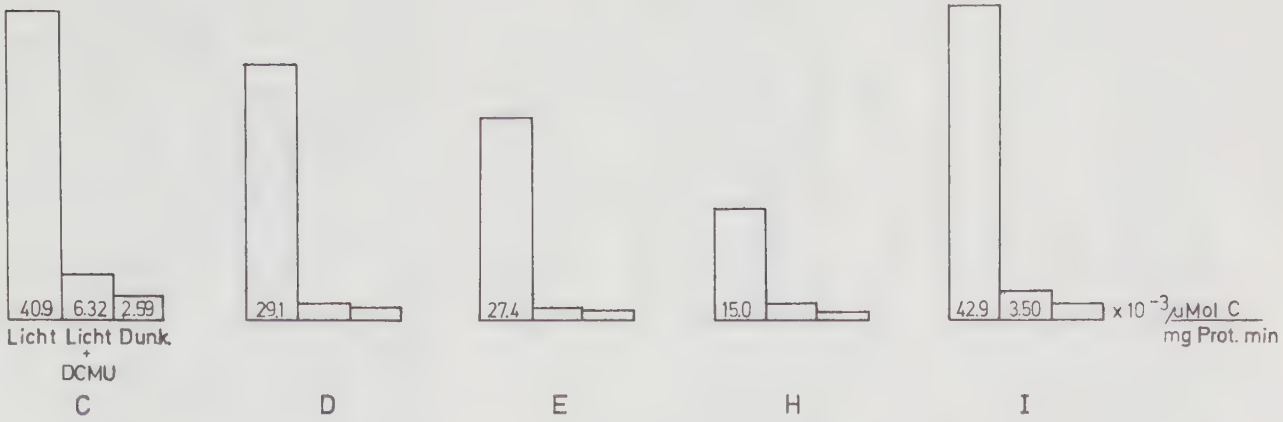


Abb. 10) Einbau von ^{14}C aus $NaH^{14}CO_3$ in zelleigene Verbindungen während des exponentiellen Wachstums in photoautotroph kultivierte Stämme von Chl. stellata unter verschiedenen Versuchsbedingungen. Beleuchtungsstärke = 10^4 lux, Versuchstemperatur = 30^0 C, Extinktion der Algensuspensionen bei λ 1000 nm = 1,3

deren photosynthetische CO_2-Fixierung - verglichen mit den Raten autotroph kultivierter Algen - um ca. 90% gesenkt und entspricht ungefähr den photoautotrophen Einbauraten nach DCMU-Vergiftung (vgl. Tab. 6 und Abb. 10). Den niedrigsten Wert für die photosynthetische CO_2-Fixierung hat Stamm H mit 1,38 x 10^{-3} µMol eingebautem Kohlenstoff/mg Protein·min. Er liegt noch um 50% unter den bereits sehr niedrigen Raten der anderen untersuchten Stämme.

Anzumerken ist, daß eine viel geringere Differenzierung der Photosyntheseleistung bei autotroph gewachsenen Chlamydobotrys-Stämmen festzustellen ist, wenn diese als O_2-Entwicklung (Tab. 5) und nicht - wie oben besprochen - als CO_2-Fixierung gemessen wird. Die höchste Leistung mit 28,1 x 10^{-3} µl O_2/ µg Chlorophyll·min hat Stamm C; die niedrigste Stamm H, die jedoch nur um 30% unter der O_2-Rate von Stamm C liegt.

Bei exponentiell photoheterotroph gewachsenen Stämmen konnte polarographisch eine photosynthetische O_2-Entwicklung nicht mehr gemessen werden. Vielmehr war in dichten Algensuspensionen ($E_{\lambda 1000\ nm}$= 1,3) der untersuchten Stämme eine starke O_2-Aufnahme festzustellen, die im Starklicht (bei verdünnten Algensuspensionen mit $E_{\lambda 1000\ nm}$= 0,8) zwar schwächer als im Schwachlicht war, aber auch hier niemals zu einer den Kompensationspunkt überschreitenden O_2-Entwicklung führte.

	x 10^{-3} µMol C / mg Protein·min				
Stamm	C	D	E	H	I
Licht	3,77	3,35	3,74	1,38	3,40

Tab. 6) Einbau von ^{14}C aus $NaH^{14}CO_3$ in zelleigene Verbindungen im Licht während des exponentiellen Wachstums photoheterotroph kultivierter Stämme von Chl. stellata. Beleuchtungsstärke = 10^4 lux, Versuchstemperatur = 30° C, Extinktion der Algensuspensionen bei λ 1ooo nm = 1,3

5. b) Leistung der Carboxydismutase

Parallel zum guten photoautotrophen Wachstum der Chlamydobotrys-Stämme C und I und ihren hohen photosynthetischen CO_2-Einbauleistungen haben diese beiden Stämme auch eine hohe Leistung des für die CO_2-Fixierung verantwortlichen Enzyms Carboxydismutase (Ribulose-1,5-diphosphatcarboxylase; Tab. 7). Die Stämme D und E zeigen unter Autotrophie - verglichen mit Stamm C - eine um 30% und Stamm H sogar eine um 50% niedrigere Aktivität dieses Enzyms. Hieraus darf geschlossen werden, daß stammspezifische Unterschiede in der

Leistung der Carboxydismutase für die unterschiedlichen Photosyntheseleistungen (gemessen als CO_2-Einbauraten) der autotroph ernährten Chlamydobotrys-Stämme verantwortlich sind.

Bei den Stämmen E,H und I sinkt die Aktivität dieses Enzyms bei photoheterotropher Kultur auf ungefähr ein Drittel ab, bleibt jedoch stets deutlich nachweisbar. Bei den Algen der Stämme C und D wird die Aktivität der Carboxydismutase durch

Carboxydismutase

	x 10^{-3} µMol C / mg Protein·min				
Stamm	C	D	E	H	I
Licht + CO_2	36,5	24,1	28,1	17,0	29,1
Licht + Acetat	33,8	17,6	11,8	5,57	9,10

Tab. 7) Aktivität der Carboxydismutase während des exponentiellen Wachstums photoautotroph (Licht + CO_2) und photoheterotroph (Licht + Acetat) kultivierter Stämme von Chl. stellata. Beleuchtungsstärke = 10^4 lux, Versuchstemperatur = 30^o C, Extinktion der Algensuspensionen bei λ 1ooo nm = 1,3

die photoheterotrophen Bedingungen nur um ca. 30% gesenkt. Im gewissen Widerspruch hierzu stehen die Photosynthese-leistungen während des photoheterotrophen Wachstums der Stämme C und D, denn nach Ernährung mit Acetat ist bei allen Stämmen der CO_2-Einbau um 90% - verglichen mit den Raten photoautotroph kultivierter Algen - gesenkt. Die Aktivität der Carboxydismutase nimmt bei Photoheterotrophie jedoch nur um 10% (Stamm C) bzw. 27% (Stamm D) ab. Hieraus darf abgeleitet werden, daß unter photoheterotrophen Bedingungen nicht allein die Carboxydismutase für die schwache Photo-syntheseleistung (gemessen als CO_2-Einbauraten) der Chlamydobotrys-Stämme verantwortlich ist, sondern zusätzlich andere Faktoren hinzutreten, auf die im weiteren Verlauf dieser Arbeit an anderer Stelle noch eingegangen werden wird.

Somit bleibt festzuhalten, daß die vorgestellten Ergebnisse über die Photosyntheseleistungen und die Aktivitäten der Carboxydismutase die aus den autotrophen Wachstumsleistungen der Chlamydobotrys-Stämme abgeleitete Gruppierung bestätigen. Denn die Algen der autotrophen Stämme C,D und I zeigen hohe CO_2-Einbauraten und Carboxydismutase-Aktivität während E und H als Vertreter der photoheterotrophen Gruppe geringere Leistungen haben.

5. c) Der Acetat-Stoffwechsel

Der stoffwechselphysiologischen Leistung des Acetatstoff= wechsels wurde auf folgende Weise nachgegangen: 1) Anwendung titrametrischer Methoden, 2) Einsatz von ^{14}C-markiertem Na-Acetat unter verschiedenen Versuchsbedingungen, 3) Überprüfen der Aktivität des "Leitenzyms" des Acetatstoff= wechsels Isocitratlyase (Isocitatase). Bei den titramet= rischen Messungen wurde die Essigsäure-Aufnahme (= Assimi= lation) aus der Nährlösung im Licht und im Dunkeln bestimmt. Die Verwendung der Isotopen-Technik erfolgte außer der in Kap. III. 5. c.2) beschriebenen Versuchsbedingung im Licht, auch im Licht nach Vergiftung mit DCMU sowie im Dunkeln (Kap. III. 5. c.4). Dabei wurde (I) sowohl der insgesamt verarbeitete (= aufgenommen, assimiliert) als auch (II) der in zelleigene Verbindungen eingebaute und (III) der als CO_2 bei der Acetatoxidation freigesetzte Acetatkohlenstoff aus ^{14}C-markiertem Na-Acetat gemessen.

5. c.1) Die lichtabhängige Essigsäureaufnahme aus der Nährlösung

Die folgenden Versuche wurden in der in Kap. II. 5) beschrie= benen Anlage durchgeführt, die eine einfache quantitative Essigsäureassimilation während des Versuches in vivo ge= stattet. Diese Methode wurde zunächst der technisch aufwen=

digeren Isotopen-Technik vorgezogen. Hierbei ergab sich folgendes Bild (Abb. 11):

1) Die Aufnahme von Essigsäure ist bei allen photoheterotroph kultivierten Stämmen ein lichtabhängiger Prozeß, der im Dunkeln entweder a) nur schwach weiterläuft oder b) sofort mit Einsetzen der Dunkelheit aufhört. 2) Die Stämme E und H haben den höchsten Essigsäureverbrauch (Titrationsgerade, $\tan \alpha = 2{,}30$), es folgen die Stämme I und C mit $\tan \alpha = 1{,}33$. Stamm D nimmt mit $\tan \alpha = 0{,}90$ ca. 60% weniger Essigsäure aus der Nährlösung auf als E und H.

Bei photoautotroph gewachsenen Stämmen ist - nach Änderung in der Art der Kohlenstoffquelle (Acetat ersetzt CO_2) während des exponentiellen Wachstums - die Essigsäureaufnahme nur gering und läßt sich titrimetrisch erst nach einer längeren Adaptationszeit fehlerfrei messen. Möglicherweise ist diese gewählte Methode zu unempfindlich, um die Acetatassimilation in photoautotroph gewachsenen Algen zu bestimmen.

5. c.2) Assimilation und Einbau von ^{14}C-markiertem Na-Acetat im Licht

Die Ergebnisse über den Einbau von ^{14}C aus radioaktiv markiertem Na-Acetat zeigen bereits bei autotroph kultivierten Chl. stellata deutliche Unterschiede zwischen den Stämmen, sowohl hinsichtlich (I) der Menge des insgesamt verarbei-

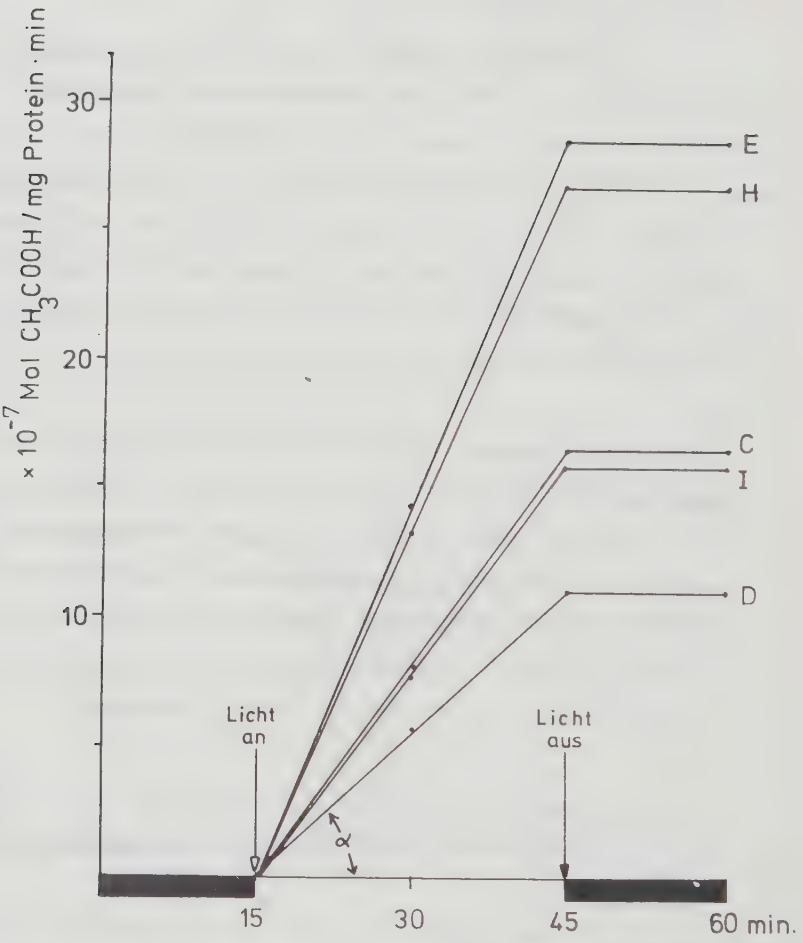


Abb. 11) Lichtabhängige Aufnahme von Essigsäure während des exponentiellen Wachstums photoheterotroph ernährter Stämme von Chl. stellata. Versuchsdauer = 60 min., Temperatur = 30° C, Beleuchtungsstärke = 4 x 10^4 lux, Extinktion der Algensuspensionen bei λ 1ooo nm = 1,2

teten Kohlenstoffs aus Acetat, als auch im Anteil des (II) in zelleigene Verbindungen eingebauten und (III) des als CO_2 freigesetzten Acetatkohlenstoffs an der Gesamtassimilation (Tab. 8). So hat Stamm E im Licht mit 146,6 x 10^{-3} µMol Acetatkohlenstoff/mg Protein·min die höchste Assimilationsrate von allen Stämmen, gefolgt von Stamm H mit einer nur um 30% geringeren Assimilationsleistung (A I). Die Stämme C,D und I haben im Licht mit ca. 50,0 x 10^{-3} µMol Acetatkohlenstoff nur ungefähr 30% der Leistung des Stammes E.

Gegenüber autotropher Kultur ist die Photoassimilation von Acetat bei photoheterotroph gewachsenen Stämmen durchschnittlich um 150% erhöht (Tab. 9, A I): Hierbei können E u. H mit ~ 260,0 x 10^{-3} µMol weitaus mehr Acetatkohlenstoff/mg Protein·min insgesamt aufnehmen als C und I. Die Leistung von Stamm D liegt jedoch nur um 30% unter der von E und H.

Ein Vergleich der Mengen des im Licht insgesamt aufgenommenen mit der des in zelleigene Verbindungen eingebauten Acetatkohlenstoffs (A I und A II in Tab. 8 und in Tab. 9) ergibt bemerkenswerterweise, daß Stamm D während autotrophen und photoheterotrophen Wachstums nur weniger als die Hälfte des assimilierten Acetatkohlenstoffs in zelleigene Verbindungen einbauen kann: bis zu 60% des insgesamt aufgenommenen Acetatkohlenstoffs werden daher als CO_2 freigesetzt. Alle anderen überprüften Stämme sind während autotrophen und photoheterotrophen Wachstums in der Lage, vom insgesamt aufgenommenen

Acetatkohlenstoff bis zu 75% in zelleigene Verbindungen einzubauen und entwickeln nur wenig CO_2. Am extremsten ist dies der Fall bei den Stämmen E und H. Das Verhältnis eingebauter/freigesetzter Acetatkohlenstoff liegt für Stamm E und H mit 2,5 am besten, für D mit ca. 0,7 am ungünstigsten. Damit zeigen die Chlamydobotrys-Stämme eine deutliche Übereinstimmung sowohl in ihren Acetat-Assimilationsleistungen als auch -Einbauleistungen, unabhängig davon ob sie autotroph oder photoheterotroph kultiviert worden sind.

Der in zelleigene Verbindungen eingebaute Acetatkohlenstoff (B II in Tab. 8 und in Tab. 9) stammt primär aus der Methylgruppe (C_2-Atom). Hierin unterscheiden sich die untersuchten Chlamydobotrys-Stämme nur wenig voneinander.

Deutlichere Unterschiede zwischen den Stämmen ergeben sich jedoch hinsichtlich desjenigen C-Atoms, das bei der Verarbeitung aus insgesamt assimiliertem Acetatkohlenstoff im Licht als CO_2 freigesetzt wird (C III in Tab. 8 und in Tab. 9). Unabhängig von der Ernährungsart sind beim Stamm D zu ungefähr gleichen Teilen am freigesetzten CO_2 das C_1- und das C_2-Atom beteiligt: 55 bzw. 45% . Bei den anderen Stämmen hingegen stammt der größte Teil des freigesetzten CO_2 - bis zu 81% - aus der Carboxylgruppe des Acetats (C_1-Atom).

Die soeben geschilderten Ergebnisse zeigen deutlich, daß zwischen den Stämmen von Chlamydobotrys sowohl Unterschiede

	x 10^{-3} µMol Acetatkohlenstoff / mg Protein·min									
	A Stamm :	C		D		E		H		I	
I	assimiliert	42,5		54,1		146,6		107,0		49,7	
II	eingebaut	22,3	52%	21,4	40%	96,6	67%	77,5	72%	27,1	55%
III	freigesetzt	20,2	48%	32,7	60%	50,0	33%	29,5	28%	22,6	45%
	B										
II	eingebaut	22,3		21,4		96,6		77,5		27,1	
	C_1 - Atom	7,4	33%	8,3	39%	35,7	37%	30,6	39%	7,4	27%
	C_2 - Atom	14,9	67%	13,1	61%	60,9	63%	46,9	61%	19,7	78%
	C										
III	freigesetzt	20,2		32,7		50,0		29,5		22,6	
	C_1 - Atom	14,3	71%	18,0	55%	39,9	80%	22,1	75%	18,4	81%
	C_2 - Atom	5,9	29%	14,7	45%	10,1	20%	7,4	25%	4,2	19%

Tab. 8) Im Licht verarbeiteter Kohlenstoff aus ^{14}C-markiertem Na-Acetat bei photoautotroph kultivierten Stämmen von Chl. stellata. A) Insgesamt verarbeiteter (= assimiliert I), davon in zelleigene Verbindungen eingebauter (= eingebaut II) und als CO_2 freige= setzter (= freigesetzt III) Acetatkohlenstoff.
B) Anteil des C_1- und C_2-Atoms am eingebauten (II) und C) Anteil des C_1- und C_2-Atoms am freigesetzten Acetatkohlenstoff (III).

	x 10^{-3} µMol Acetatkohlenstoff/mg Protein · min									
	A Stamm :	C		D		E		H		I	
I	assimiliert	126,2		182,6		279,0		255,6		136,3	
II	eingebaut	91,4	72%	85,1	47%	201,0	72%	191,4	75%	94,5	69%
III	freigesetzt	34,8	28%	97,5	53%	78,0	28%	64,2	25%	41,8	31%
	B										
II	eingebaut	91,4		85,1		201,0		191,4		94,5	
	C_1 - Atom	34,2	37%	29,9	35%	84,5	42%	67,4	35%	33,9	36%
	C_2 - Atom	57,2	63%	55,2	65%	116,5	58%	124,0	65%	60,6	64%
	C										
III	freigesetzt	34,8		97,5		78,0		64,2		41,8	
	C_1 - Atom	26,0	75%	54,4	56%	54,8	72%	49,8	78%	33,3	80%
	C_2 - Atom	8,8	25%	43,1	44%	23,2	28%	14,4	22%	8,5	20%

Tab. 9) Im Licht verarbeiteter Kohlenstoff aus ^{14}C-markiertem Na-Acetat bei photoheterotroph kultivierten Stämmen von Chl.stellata. A) Insgesamt verarbeiteter (= assimiliert I), davon in zelleigene Verbindungen eingebauter (= eingebaut II) und als CO_2 freigesetzter (= freigesetzt III) Acetatkohlenstoff.
B) Anteil des C_1- und C_2-Atoms am eingebauten (II) und C) Anteil des C_1- und C_2-Atoms am freigesetzten Acetatkohlenstoff (III).

in ihrer Assilationsfähigkeit als auch in der weiteren Verarbeitung von assimiliertem Acetat bestehen. Bei den Stämmen mit hohen Assimilationsleistungen (E und H) wird der größte Anteil des Acetatkohlenstoffs direkt in zelleigenes Material eingebaut, nur ein geringer Anteil wird oxidativ verarbeitet. Den Beweis liefern die Ergebnisse über das Verhältnis des in zelleigen Verbindungen eingebauten zum insgesamt assimilierten Acetatkohlenstoff, sowie über den Anteil des C_1- und des C_2-Atoms des Acetat im freigesetzten Kohlendioxid. Da nämlich bei einer ausschließlichen Assimilation über den Glyoxylsäurezyklus 25% des Acetatkohlenstoffs als CO_2 abgegeben werden und diese Zahl - nach autotropher Kultur (Tab. 8) - bei den Stämmen E und H bei 28 bzw. 33% liegt, werden hier ungefähr 10% der insgesamt assimilierten Acetatmoleküle über den Tricarbonsäurezyklus oxydiert und rund 90% direkt über den Glyoxylsäurezyklus und anschließendem Embden-Meyerhof-Weg den zelleigenen Synthesen zugeführt. Für diese Aussage spricht ebenfalls der niedrige Anteil des C_2-Acetatkohlenstoffs am freigesetzten CO_2, da dieser nur über den Tricarbonsäurezyklus, nicht aber über den Glyoxylsäurezyklus freigesetzt wird (Wießner und Kuhl 1962, Kornberg 1966, Wießner 1970).

Demgegenüber wird von Stamm D nur um 40% des assimilierten Acetatkohlenstoffs zum Aufbau von zelleigenem Material verwandt und ca. 60% oxidativ verarbeitet. Rund die Hälfte des entwickelten Kohlendioxid stammen jeweils aus der Carboxyl-

und aus der Methylgruppe. Hier liegt offenkundig eine weit höhere Beteiligung des Citronensäurezyklus an der Acetat=verarbeitung vor, als es bei den Stämmen E und H der Fall war (Wiame 1957, Danforth 1961, Wießner 1962).

Damit stellt sich die Frage, ob diese Unterschiede in der Beteiligung des Glyoxylsäurezyklus an der Verarbeitung des Acetats ihre Ursache in unterschiedlichen Aktivitäten der im Glyoxylsäurezyklus ablaufenden Enzymreaktionen in den verschiedenen Stämmen hat. Es wurden daher zur Prüfung dieser Frage die Aktivität des "Schlüsselenzyms" im Glyoxyl=säurezyklus, nämlich der Isocitratlyase, bei den verschieden=en Chlamydobotrys-Stämmen untersucht.

5. c.3) Aktivität der Isocitratlyase

In Tab. 10) sind die Enzymaktivitäten der Isocitratlyase bei den überprüften Chlamydobotrys-Stämmen nach autotropher und nach photoheterotropher Ernährung angegeben. Unabhängig von den Ernährungsbedingungen ist stets eine deutliche Isocitratlyase-Aktivität nachweisbar. Die Umsatzraten dieses Enzyms sind für die Stämme E,H und I mit ca. 2,0 bis 3,0 x 10^{-2} µMol gebildeter Glyoxylsäure/mg Protein·min am höchsten bei Photoheterotrophie, gefolgt von Stamm C mit 1,69 x 10^{-2} µMol und D mit 0,85 x 10^{-2} µMol Glyoxylsäure/mg Protein·min. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, daß am Aufbau von zell=eigenem Material aus Acetat bei den meisten Stämmen der Glyoxylsäurezyklus beteiligt ist. Gemessen an der Aktivität der Isocitratlyase ist der Glyoxylsäurezyklus bei Stamm D hingegen weit weniger aktiv.
Diese Unterschiede in der Enzymaktivität stimmen in der Regel mit den von den Stämmen gezeigten Acetat Assimilations=raten und mit den bei photoheterotropher Kultur gezeigten Wachstumsleistungen überein: einer hohen Enzymaktivität im Glyoxylsäurezyklus entsprechen hohe Assimilations=leistungen und Wachstumsleistungen (Stamm E und H). Ebenso verhält sich Stamm D, dessen Wachstumsleistungen bei photo=heterotropher Kultur nur schwach sind.

Bei autotropher Ernährungsart liegen die Umsatzraten der Isocitratlyase bei allen untersuchten Stämmen niedriger als

bei photoheterotropher Kultur. Am extremsten ist diese Senkung der Enzymaktivität bei Stamm D: 0,85 x 10^{-2} µMol bei photoheterotropher Kultur verglichen mit 0,25 x 10^{-2} µMol gebildeter Glyoxylsäure/mg Protein·min bei Autotrophie. Beim Stamm C, der nach den bisherigen Befunden ebenfalls zur autotrophen Gruppe der Chlamydobotrys-Stämme gehört, sinkt die Enzymaktivität auf ungefähr ein Drittel ab. Bei den Stämmen der photoheterotrophen Gruppe E und H nimmt die Aktivität der Isocitratlyase hingegen nur um die Hälfte ab.

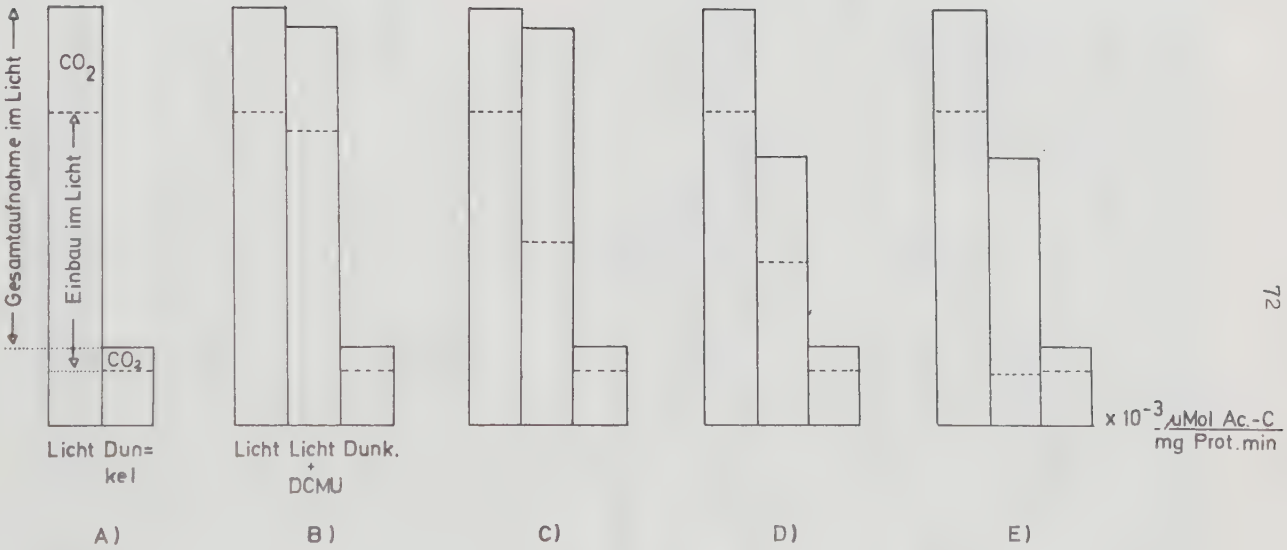
Somit ist festzuhalten, daß der den verschiedenen Chlamydo= botrys-Stämmen zugeordnete Gruppencharakter - autotropher oder photoheterotropher Typ - soweit es die Aktivität des Glyoxylsäurezyklus betrifft, auch nach autotropher Er= nährungsweise noch deutlich hervortritt.

	x 10^{-2} µMol Glyoxylsäure/mg Protein·min				
Stamm	C	D	E	H	I
Licht + CO_2	0,51	0,25	1,32	1,50	1,23
Licht + Acetat	1,69	0,85	2,09	3,04	1,91

Tab. 10) Aktivität der Isocitratlyase während des exponen= tiellen Wachstums photoautotroph (Licht + CO_2) und photo= heterotroph (Licht + Acetat) kultivierter Stämme von Chl. stellata

Ungeklärt bleibt bislang die Rolle des Photosyntheseappa=rates an der Assimilation von Acetatkohlenstoff, denn auf photosynthetischem Wege kann zum einen durch Photophospho=rylierung ATP für die direkte Acetatassimilation im Licht bereitgestellt und zum anderen bei der Acetatverarbeitung freigesetztes Kohlendioxid photosynthetisch fixiert werden (= indirekte C-Fixierung aus Acetat), wodurch die Gesamt=assimilation von Kohlenstoff aus Acetat über den durch direkte Assimilation erreichbaren Wert ansteigen kann. Für die Photophosphorylierung bestehen ferner theoretisch ver=schiedene Möglichkeiten: a) auf dem Weg der pseudozyklischen und b) durch zyklische Photophosphorylierung. Welche dieser Möglichkeiten bei den verschiedenen Stämmen von Chlamydo=botrys eine Rolle spielt, kann durch Einsatz des Photo=synthesegiftes DCMU und den Vergleich der lichtabhängigen und der Dunkel-Fixierungsraten für Acetatkohlenstoff be=antwortet werden. Denn DCMU soll den offenkettigen Elek=tronentransport unterbrechen und würde damit sowohl die pseudozyklische Photophosphorylierung als auch die indirekte C-Assimilation aus Acetat zum Erliegen bringen, und ein Vergleich des Anteils des im Licht nach Vergiftung mit DCMU sowie durch die unvergifteten Zellen im Dunkeln aus Acetat freigesetzten CO_2 läßt Rückschlüsse auf die Beteiligung der indirekten C-Fixierung an der Gesamtassimilation von Acetatkohlenstoff zu.

Diese Überlegungen sollen anhand mehrerer Modellvorstellungen über die Acetatassimilation näher erläutert werden:



Modellvorstellungen zur C-Assimilation aus Acetat unter verschiedenen Versuchsbedingungen (im Licht, im Licht nach Vergiftung mit DCMU und im Dunkeln) bei photoautotroph und photo= heterotroph ernährten Stämmen von Chl. stellata (weitere Erläuterungen im Text)

A) Im Licht findet eine hohe, im Dunkeln nur eine geringe Gesamtassimilation von Acetatkohlenstoff statt; ein Beweis für die Bereitstellung von Lichtenergie zur Acetatassimilation (= Photoassimilation von Acetat).

B) Senkt das Photosynthesegift DCMU diese Assimilationsleistung nicht oder nur geringfügig, und bleibt das Verhältnis der Mengen des freigesetzten CO_2 und des in zelleigene Verbindungen eingebauten Acetatkohlenstoffs unverändert, so besteht keine Abhängigkeit des Photoprozesses vom offenkettigen Elektronentransport; dieser wird weder zur Photophosphorylierung benötigt, noch ist die photosynthetische C-Fixierung an der Acetatassimilation beteiligt. ATP wird durch zyklische Photophosphorylierung angeliefert und der Acetatkohlenstoff auf direktem Wege (= Glyoxylsäurezyklus + Gluconeogenese) assimiliert.

C) Senkt jedoch DCMU die Gesamtassimilation nur unwesentlich bei gleichzeitigem Sinken des Einbaus von Acetatkohlenstoff in zelleigene Verbindungen und Zunahme der Menge des freigesetzten CO_2, dann ist die C-Fixierung auf indirektem Wege unter Beteiligung des offenkettigen Elektronentransportes an der Kohlenstoffassimilation aus Acetat im Licht beteiligt, alleinig oder neben der direkten Acetatassimilation.

D) Werden aber durch DCMU die Gesamtaufnahme sowie der Einbau von Acetatkohlenstoff und die CO_2-Entwicklung in gleichem Maße gesenkt, dann muß bereits die lichtabhängige Phosphorylierung als Lieferant von ATP zur Acetatassimi= lation unterbrochen worden sein, und es liegt der Fall der pseudozyklischen Photophosphorylierung als ATP-liefernder Prozeß zur Acetatassimilation vor.

E) Verringert DCMU hingegen den Kohlenstoff-Einbau aus Acetat stärker als die Gesamtassimilation und nimmt dabei die Menge des als CO_2 freigesetzten Acetatkohlenstoffs zu, dann wird zusätzlich Acetatkohlenstoff auf indirektem Wege fixiert.

5. c.4) Assimilation und Einbau von ^{14}C-markiertem Na-Acetat im Licht nach Vergiftung mit DCMU und im Dunkeln

Den für photo-autotroph und -heterotroph kultivierte unvergiftete Algen ermittelten Daten über die Assimilation von Acetatkohlenstoff sind in den Tabellen 11) und 12) und in den Abbildungen 12) und 13) die Ergebnisse für die mit DCMU vergifteten Organismen, sowie die im Dunkeln beobachteten Daten gegenübergestellt. Generell ist festzustellen, daß DCMU die Acetatassimilation der photoheterotroph kultivierten Stämme stärker als die der photoautotrophen hemmt. Insgesamt betrachtet, ergibt sich jedoch in beiden Fällen das gleiche Bild.

Bei autotropher Kultur wird durch DCMU bei Stamm E die lichtabhängige Gesamtassimilation nur von $146{,}6 \times 10^{-3}$ auf $132{,}7 \times 10^{-3}$ µMol Acetatkohlenstoff/mg Protein·min, und ebenso geringfügig der Kohlenstoff-Einbau um ca. 10% gesenkt (Tab. 11 und Abb. 12). Gleiches Verhalten bei insgesamt schwächerer Leistung zeigt Stamm I. Bei Stamm H verringert DCMU die Gesamtaufnahme um ca. 25% und den C-Einbau um ca. 30%. Wesentlich ist bei diesen Stämmen jedoch, daß der prozentuale Anteil des freigesetzten CO_2 nahezu unverändert bleibt oder nur geringfügig - wie im Falle von Stamm H von 28% auf 35% - zunimmt. Die C-Fixierung aus Acetat erfolgt damit bei den Stämmen E,H und I vorwiegend auf direktem Wege; bei H addiert sich zum direkten C-Einbau jedoch ein geringer Anteil von indirekter C-Fixie=

rung. Dabei stammt das zur Acetatverarbeitung bereitgestellte ATP bei den Stämmen E und I fast ausschließlich aus der zyklischen Photophosphorylierung und nur einem geringen Anteil (ca. 10%) aus der durch DCMU hemmbaren pseudozyklischen Photophosphorylierung. Die Acetatassimilation durch die Stämme E und I entspricht somit der Modellvorstellung B), die des Stammes H einer Kombination der in B) und C) geschilderten Modelle.

Im Gegensatz zu den für die Stämme E,H und I beschriebenen Verhältnissen liegen diese deutlich anders bei Stamm C (Tab. 11 und Abb. 12). Hier sinkt bei Anwesenheit von DCMU die Menge des insgesamt aufgenommenen Acetatkohlenstoffs von 42,5 x 10^{-3} auf 32,5 x 10^{-3} µMol; das entspricht einer Hemmung von ca. 25% (vergleichbar mit der o. geschilderten Hemmung bei Stamm H). Gleichzeitig nimmt jedoch die Menge des eingebauten Acetatkohlenstoffs von 52% auf 33% ab und steigt der Anteil des als CO_2 freigesetzten von 48% auf 67% an. In diesem Fall liegt eindeutig eine hohe Beteiligung der Photosynthese auf dem Wege der indirekten C-Fixierung aus Acetat an der Gesamtfixierung von Acetatkohlenstoff vor (Modell C).

Während bei allen bisher besprochenen Stämmen die Acetatassimilation auch nach Vergiftung durch DCMU stets im Licht höher ist als im Dunkeln, also in allen Fällen zu einem gewissen, bei den einzelnen Stämmen jedoch verschiedenen

Teil die zyklische Photophosphorylierung zur Bereitstellung von ATP für die Acetatassimilation beiträgt, so ist diese bei Stamm D überhaupt nicht beteiligt. Hier unterbindet DCMU völlig die lichtabhängige Acetatassimilation. Da der prozentuale Anteil des freigesetzten CO_2 sich unter dem Einfluß von DCMU erhöht, erfolgt die lichtabhängige Acetatassimilation zum Teil auf indirektem Wege und unter Nutzung von auf pseudozyklischem Wege gewonnenen ATP, wobei offen bleiben muß, ob eine photosynthetische Fixierung von CO_2 das aus der normalen (Dunkel-) Oxydation von Acetat stammt, nicht ebenfalls zur Gesamtassimilation beiträgt (vgl. Tab.11/12, Abb. 12/13).

Nach photoheterotropher Kultur stimmen die Verhältnisse über die Beteiligung des ATP liefernden Elektronentransportsystems sowie der indirekten C-Fixierung an der Acetatassimilation der untersuchten Stämme E und H größenordnungsmäßig mit den Ergebnissen bei Autotrophie überein, nicht hingegen bei den Stämmen I und C (Tab. 12 und Abb. 13). Bei diesen beiden Stämmen sinkt durch DCMU die Gesamtassimilation im Licht von ca. 130,0 x 10^{-3} µMol auf ca. 70,0 x 10^{-3} µMol Acetatkohlenstoff/mg Protein·min um 50% ab, während nach Autotrophie die Gesamtaufnahme von Acetatkohlenstoff durch DCMU höchstens um 25% verringert wird. Bei Stamm C nimmt jedoch der prozentuale Anteil des eingebauten Acetatkohlenstoffs von 72% auf 54% ab, bei I bleibt er hingegen mit 69% konstant. Gleichzeitig nimmt bei Stamm I die Menge des freigesetzten CO_2 nicht zu, während sie bei

C von 28% auf 46% ansteigt. Beiden gemeinsam ist demnach eine Beteiligung der durch DCMU zu hemmenden pseudozyklischen Photophosphorylierung an der Gesamtassimilation mit entweder unverändertem Anteil an freigesetztem CO_2 und somit direkter C-Fixierung mittels zyklischer Photophosphorylierung beim Stamm I (Modell D) oder mit durch DCMU verhinderter indirekter C-Fixierung aus Acetat beim Stamm C (Modell E).

x 10^{-3} µMol Acetatkohlenstoff/mg Protein·min										
Licht	Stamm:	C		D		E		H		I	
assimiliert		42,5		54,1		146,6		107,0		49,7	
eingebaut		22,3	52%	21,4	40%	96,6	67%	77,5	72%	27,1	55%
freigesetzt		20,2	48%	32,7	60%	50,0	33%	29,5	28%	22,6	45%
Licht + DCMU											
assimiliert		32,5		33,6		132,7		79,7		44,9	
eingebaut		10,7	33%	14,5	43%	88,2	68%	52,6	65%	26,0	58%
freigesetzt		21,8	67%	19,1	57%	44,5	32%	27,1	35%	18,9	42%
Dunkel											
assimiliert		30,9		46,3		66,8		76,2		36,0	
eingebaut		13,3	43%	18,6	40%	19,1	29%	33,4	44%	10,9	30%
freigesetzt		17,6	57%	27,7	60%	47,7	71%	42,8	56%	25,1	70%

Tab. 11) Verarbeitung von ^{14}C-markiertem Na-Acetat bei photoautotroph kultivierten Stämmen von Chl. stellata unter verschiedenen Versuchsbedingungen: im Licht, im Licht nach Vergiftung mit DCMU sowie im Dunkeln

assimiliert: Gesamtmenge des verarbeiteten Acetatkohlenstoffs, hiervon:

eingebaut: in zelleigene Verbindungen eingebauter und

freigesetzt: als CO_2 aus Acetat freigesetzter Kohlenstoff

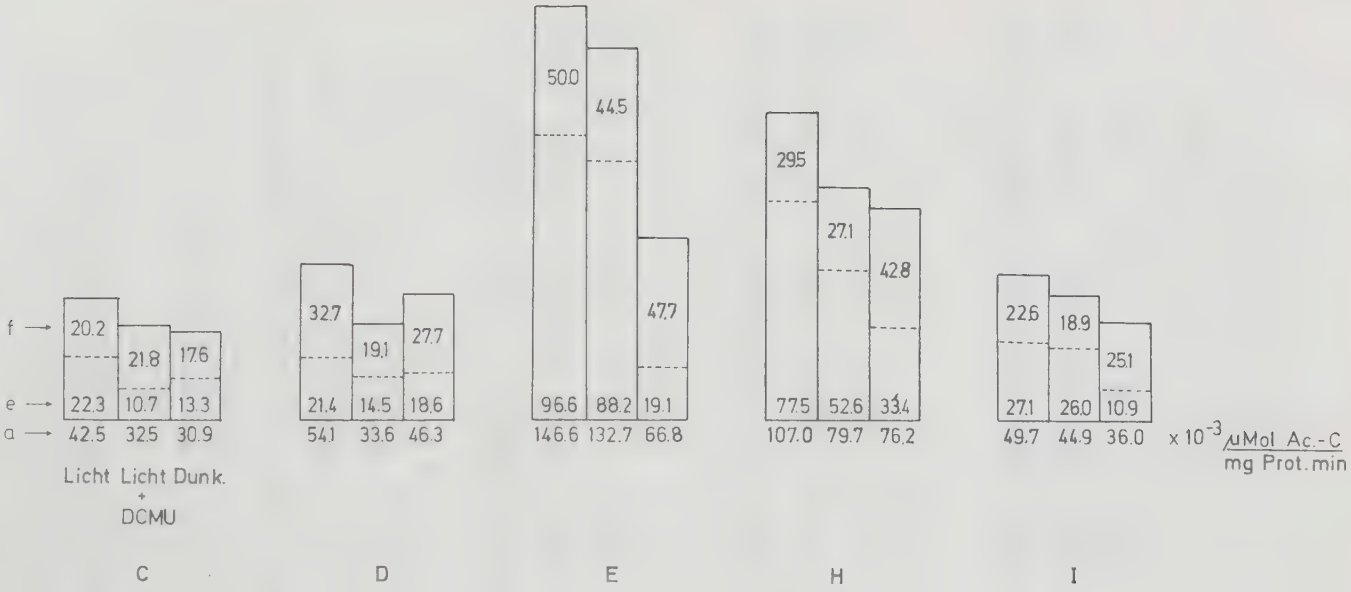


Abb. 12) Verarbeitung von ^{14}C-markiertem Na-Acetat bei photoautotroph kultivierten Stämmen von Chl. stellata unter verschiedenen Versuchsbedingungen: im Licht, im Licht nach Vergiftung mit DCMU sowie im Dunkeln. a = assimiliert: Gesamtmenge des verarbeiteten Acetatkohlenstoffs, hiervon e = eingebaut: in zelleigene Verbindungen eingebauter und f = freigesetzt: als CO_2 aus Acetat freigesetzter Kohlenstoff

x 10^{-3} µMol Acetatkohlenstoff/mg Protein·min										
Licht	Stamm:	C		D		E		H		I	
assimiliert		126,2		182,6		279,0		255,6		136,3	
eingebaut		91,4	72%	85,1	47%	201,0	72%	191,4	75%	94,5	69%
freigesetzt		34,8	28%	97,5	53%	78,0	28%	64,2	25%	41,8	31%
Licht + DCMU											
assimiliert		65,9		102,4		266,0		206,0		73,9	
eingebaut		35,5	54%	28,9	28%	169,2	65%	150,2	73%	51,3	69%
freigesetzt		30,4	46%	73,5	72%	96,8	35%	55,8	27%	22,6	31%
Dunkel											
assimiliert		47,2		110,5		86,7		83,3		28,7	
eingebaut		11,9	25%	25,2	23%	20,8	24%	36,4	44%	11,7	41%
freigesetzt		35,3	75%	85,3	77%	65,9	76%	46,9	56%	17,0	59%

Tab. 12) Verarbeitung von ^{14}C-markiertem Na-Acetat bei photoheterotroph kultivierten Stämmen von Chl. stellata unter verschiedenen Versuchsbedingungen: im Licht, im Licht nach Vergiftung mit DCMU sowie im Dunkeln

assimiliert: Gesamtmenge des verarbeiteten Acetatkohlenstoffs,

hiervon:

eingebaut: in zelleigene Verbindungen eingebauter und

freigesetzt: als CO_2 aus Acetat freigesetzter Kohlenstoff

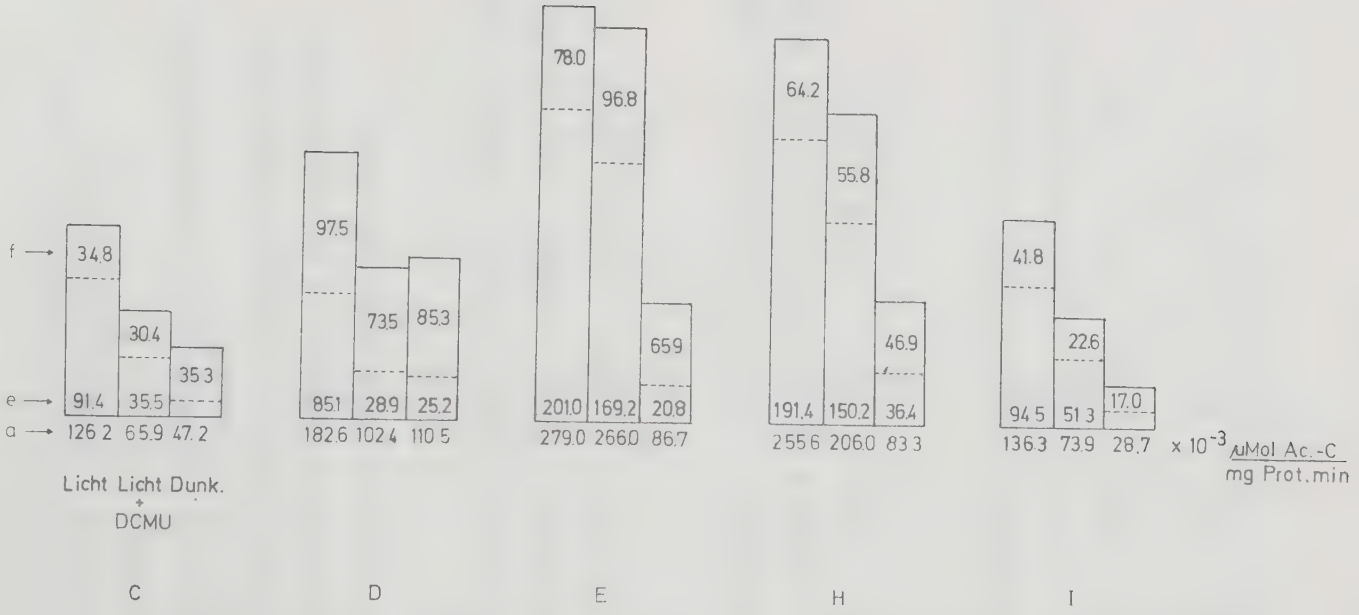


Abb. 13) Verarbeitung von ^{14}C-markiertem Na-Acetat bei photoheterotroph kultivierten Stämmen von Chl. stellata unter verschiedenen Versuchsbedingungen: im Licht, im Licht nach Vergiftung mit DCMU sowie im Dunkeln. a = assimiliert: Gesamtmenge des verarbeiteten Acetatkohlenstoffs, hiervon e = eingebaut: in zelleigene Verbindungen eingebauter und f = freigesetzt: als CO_2 aus Acetat freigesetzter Kohlenstoff

6. Energiebedarf der lichtabhängigen Essigsäureaufnahme während des photoheterotrophen Wachstums

Die bislang vorliegenden Untersuchungen zum Quantenbedarf der Photoassimilation von Acetat (Wießner und Gaffron 1964, Wießner 1965, 1966) bei photoheterotroph ernährtem Chlamydobotrys stellata haben ergeben, daß die direkte Kohlenstoffassimilation aus Acetat im nahen Infrarot ($\lambda > 700$ nm), in dem ausschließlich Photosystem I (PS I) absorbiert, mit einer hohen Quantenausbeute von 0,12 Mol Essigsäure/Einstein abläuft. Das entspricht einer Quantenzahl von ca. 8,0 Einstein/Mol Essigsäure, und nach den Angaben von Wießner (1966) einer Quantenzahl der Photophosphorylierung von 2 Einstein/Mol ATP. Im Wellenlängenbereich unterhalb λ 680 nm absorbieren beide Photosysteme (PS II und PS I); hier sinkt die Quantenausbeute (0,095 Mol Essigsäure/Einstein), d.h. der Quantenbedarf steigt auf ca. 11,0 Einstein/Mol Essigsäure. Hier geht ein beträchtlicher Teil der absorbierten Strahlungsenergie verloren, weil die direkte Acetatassimilation nicht des PS II bedarf. Bei der indirekten Kohlenstoffassimilation aus Acetat hingegen, muß das PS II bei der CO_2-Fixierung mitwirken. Die in den vorangegangenen Kapiteln geschilderten Unterschiede zwischen den verschiedenen Chlamydobotrys-Stämmen müssen sich damit auch in den Quantenzahlen der Acetatassimilation unterhalb, sowie in der Leistung oberhalb λ 700 nm widerspiegeln (Tab. 13).

Stamm:	C	D	E	H	I
λ 704 nm	0	-	8,5	7,6	0
λ 667 nm	12,2	-	10,5	13,4	12,5

Tab. 13) Quantenzahlen der lichtabhängigen Essigsäure= assimilation (Einstein/Mol Essigsäure) exponentiell photoheterotroph gewachsener Stämme von Chl. stellata

Dies ist auch der Fall. Denn bei den beiden Stämmen E und H konnten im nahen Infrarot ($\lambda >$ 700 nm) gute Quanten= ausbeuten gemessen werden, die für Stamm E die älteren Angaben bestätigen und für Stamm H mit einer Quantenzahl von 7,6 Einstein/Mol Essigsäure auf eine noch wirksamere Ausnutzung der Lichtenergie zur zyklischen Photophosphory= lierung hindeuten als dies bei E mit einer Quantenzahl von 8,5 Einstein/Mol Essigsäure der Fall ist. Auffallenderweise ist für Stamm H der Energieverlust im Wellenlängenbereich unterhalb λ 680 nm noch größer als bei Stamm E (Quantenzahl = 13,4 gegenüber 10,5 Einstein/Mol Essigsäure).

Bei den überprüften Stämmen C und I ist im nahen Infrarot überhalb λ 700 nm keine lichtabhängige Acetatassimilation nachzuweisen (Quantenzahl = 0). Dieses Ergebnis spricht bei diesen Stämmen gegen eine Beteiligung der zyklischen Photo= phosphorylierung an der Acetatassimilation und vielmehr

dafür, daß der offenkettige Elektronentransport für die lichtabhängige C-Assimilation aus Acetat vorhanden sein muß. Im Zusammenhang mit den o.a. Befunden zur C-Assimilation kommt damit auch der pseudozyklische Elektronentransport als Phosphorylierungsmechanismus in Frage, da sämtliche Versuche unter aeroben Bedingungen durchgeführt wurden. Bei Stamm D ist die lichtabhängige Acetatassimilation wesentlich niedriger als die Dunkelassimilation. Daher lassen die Quantenbestimmungen wegen zu großer Ungenauigkeit (hoher Dunkelstoffwechsel) keine eindeutigen Aussagen zu.

7. Aufnahme von Absorptionsänderungen beim Übergang von photoautotrophen zu photoheterotrophen Ernährungsbedingungen

In Abhängigkeit von den stammspezifischen Eigenschaften ändert sich für Chl. stellata nicht nur das physiologische Verhalten und die Enzymaktivität zur CO_2- oder zur Acetat-Assimilation, sondern führt beim Stamm E auch zu einer spezifischen Chloroplastenstruktur sowie zu einem spezifischen in vivo Absorptionsverhalten (Wießner 1968, Merrett 1969, Wießner und Amelunxen 1969 a,b, Wießner und French 1970). Es ergaben sich bei diesen Untersuchungen deutliche Korrelationen, die darauf hindeuten, daß zur direkten Fixierung von Acetatkohlenstoff nur solche Organismen befähigt sind, die im nahen Infrarot eine höhere, unterhalb λ 680 nm eine deutlich niedrigere Absorption zeigen als solche Organismen, die Acetatkohlenstoff indirekt unter Beteiligung der photosynthetischen CO_2-Assimilation fixieren und sich in dieser Beziehung wie normale CO_2-assimilierende Grünalgen verhalten. Ebenso wie die physiologische Adaptation beim Stamm E innerhalb von sechs Stunden bei einem Wechsel von der Autotrophie zur Photoheterotrophie abgeschlossen ist, ändert sich in dieser Zeitspanne auch das Absorptionsverhalten (Wießner und Amelunxen 1969 b). Nach der Umstellung zeigen ursprünglich autotroph kultivierte Zellen das typische Absorptionsverhalten von exponentiell photoheterotroph gewachsenen Algen. Der für ursprünglich autotroph kultivierte Zellen typische

Absorptionsgipfel bei λ 650 nm - der auf einen erhöhten Chlorophyll-b-Gehalt zurückgeht - fehlt nach sechs Stunden photcheterotrophen Wachstums völlig. Die quantitativen Absorptionsunterschiede im Wellenlängenbereich zwischen $\lambda > 630$ und < 720 nm wurden als Indikator für spezielle Chlorophyll-Proteid-Komplexe gedeutet, mit denen entweder Photosystem I ($\lambda > 700$ nm) oder PS II und I ($\lambda < 680$ nm) bei der direkten bzw. indirekten C-Assimilation aus Acetat verbunden ist.

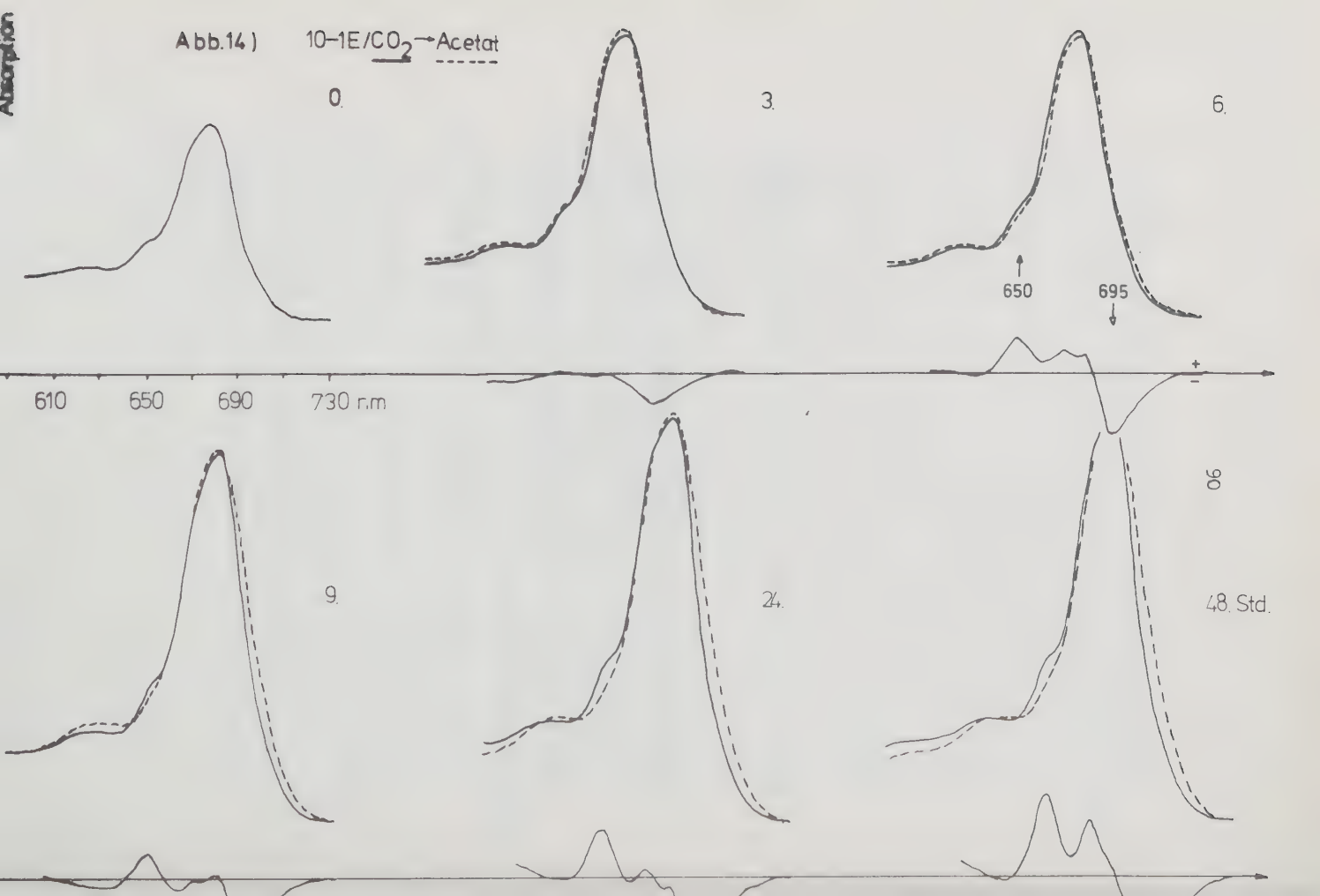
Alle hieraufhin überprüften Stämme wurden nach ca. zweitägiger autotropher Anzucht bei einer optischen Kulturdichte von $E_{1000\ nm}$ ca. 0,8 auf photoheterotrophe Ernährungsbedingungen umgestellt und ihr Absorptionsspektrum im Abstand von jeweils drei Stunden gemessen. Zum Vergleich wurde für jeden der jeweils untersuchten Stämme ein Absorptionsspektrum nach photoautotropher Kultur angefertigt, sowie ein Differenzspektrum zwischen autotroph und photoheterotroph kultivierten Zellen. Die Abbildungen 14 bis 18 zeigen, daß photoheterotroph ernährt fast alle Stämme - mit Ausnahme von D - im Wellenlängenbereich $\lambda >$ 695 nm eine höhere und unterhalb λ 680 nm eine niedrigere Absorption als die gleichen Stämme bei photoautotropher Kultur haben. Unterschiede ergeben sich zwischen den einzelnen Stämmen hinsichtlich der Dauer des Umstellungsprozesses von der Autotrophie zur Photoheterotrophie.

Die Stämme E und H (Abb. 14 und 15) haben schon sechs Stunden nach der Umstellung ihren Chlorophyll-b-Gipfel bei λ650 nm verloren, die Absorption bei dieser Wellenlänge ist gesunken und die bei λ 695 nm angestiegen. Deutlich zeigt dies das Differenzspektrum: der positive Chlorophyll-b-Gipfel und der negative bei λ 695 nm treten bei den autotroph gezogenen Algen eindeutig hervor. Zu späteren Zeitpunkten des Umstellungsvorganges gemessene Absorptions- und Differenzspektren zeigen gegenüber dem nach sechs Stunden aufgenommenen keine wesentlichen Veränderungen.

Die Umstellung von der Autotrophie auf die Ernährung mit Acetat benötigt bei den Stämmen C und I (Abb. 16 und 17) länger als sechs Stunden. Erst nach ca. neunstündigem Wachstum mit der neuen Kohlenstoffquelle ist das Absorptionsspektrum der photoheterotrophen von dem der autotrophen Algen zu unterscheiden.

Nur geringfügig sind die Unterschiede im Absorptionsverhalten des Stammes D bei photoheterotropher Kultur verglichen mit dem autotroph angezogener Organismen (Abb. 18). Er hat demnach keinen Umstellungsprozeß durchgemacht. Die Unterschiede im Differenzspektrum bei λ > 695 nm bleiben unklar.

Abb. 14,15,16,17 und 18) Absorptionsspektren von Chloro= plastenpartikeln verschiedener Stämme von Chl. stellata während der ernährungsphysiologischen Umstellung von der Autotrophie (CO_2) zur Photoheterotrophie (Acetat). Zum Vergleich ist jeweils das Spektrum autotroph kultivierter Algen in den Abbildungen angegeben, sowie das zugehörige Differenzspektrum der autotrophen und photoheterotrophen Chloroplastenpartikel.
O. Std. = Beginn der Adaptation an photoheterotrophe Er= nährungsbedingungen.


Absorption
Abb.14)
10-1E/CO2→Acetat
0.
3.
6.
650
695
610
650
690
730 n.m
9.
24.
48. Std.
90

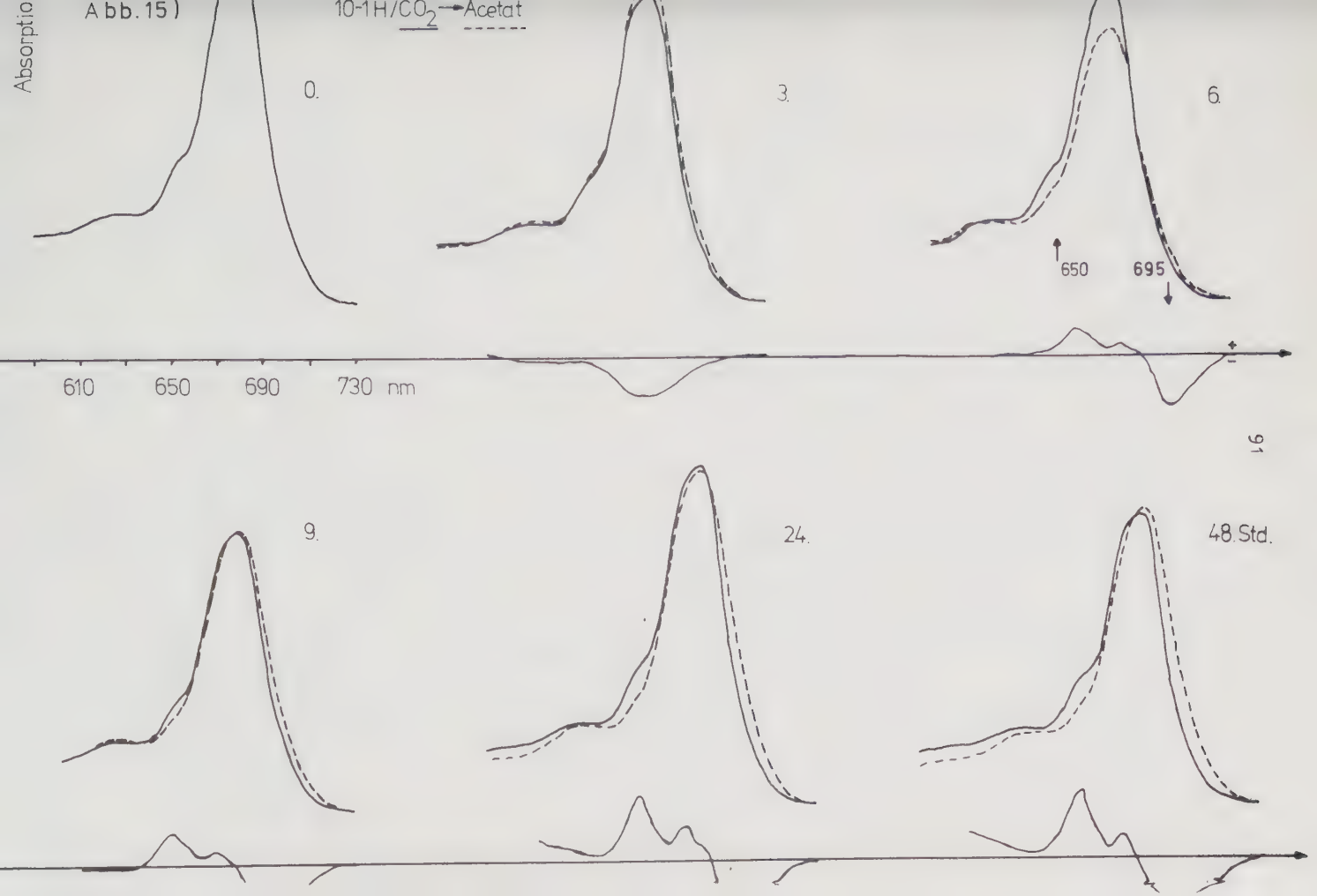
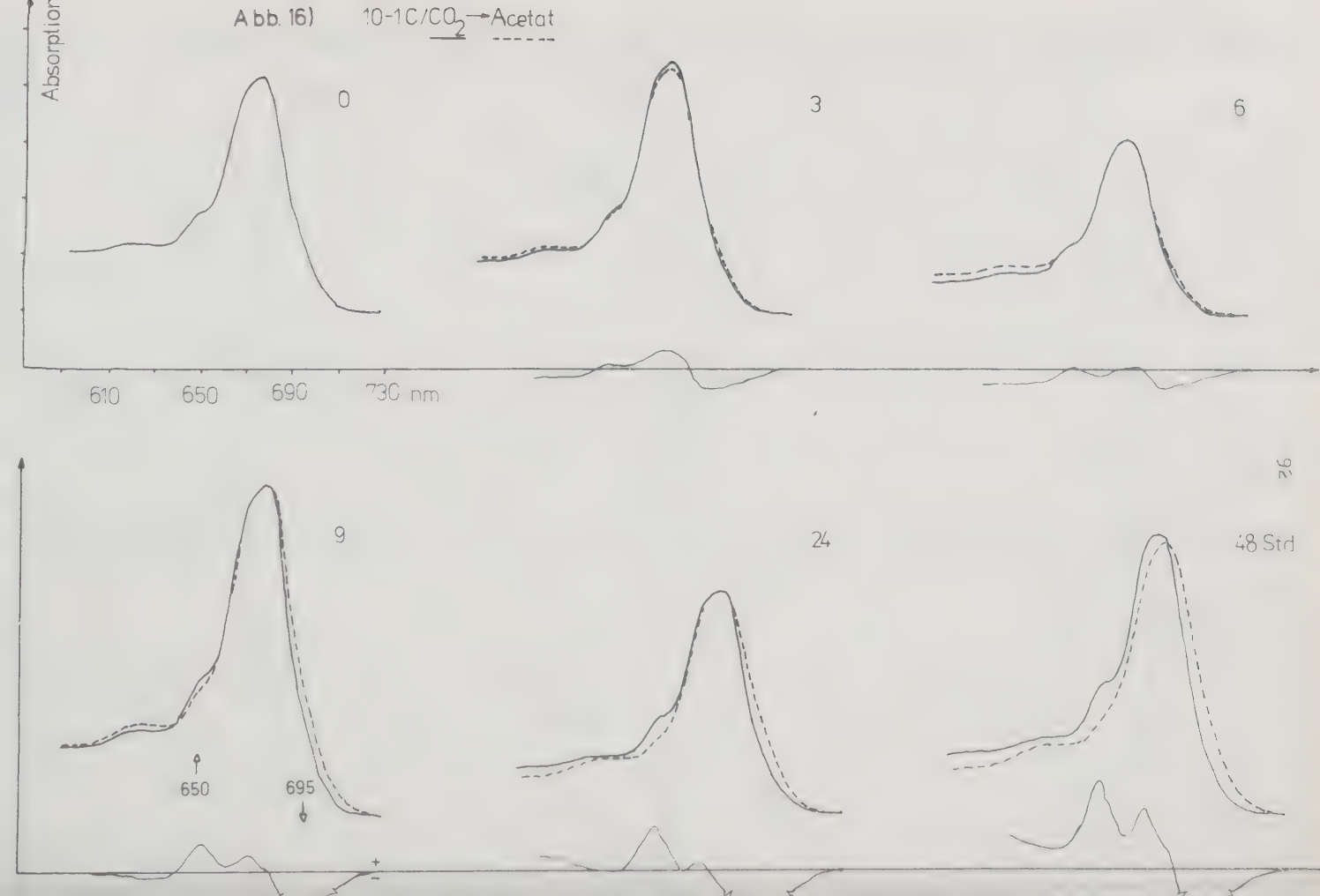
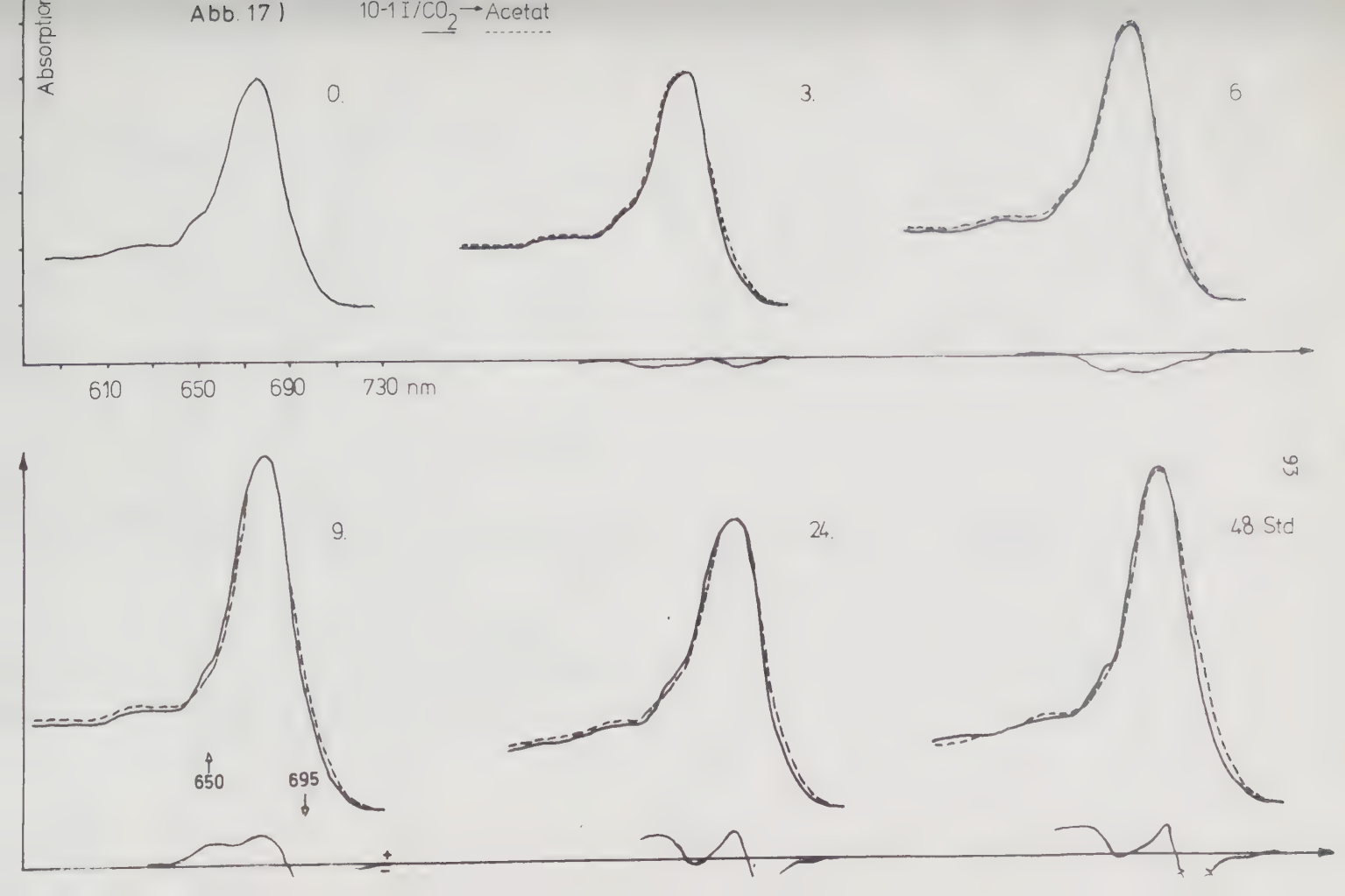


Abb. 15)
10-1 H/CO2 → Acetat
Absorption
0.
3.
6.
650
695
610
650
690
730 nm
9.
24.
48. Std.


Absorption
Abb. 16) 10-1C/CO2 → Acetat
0
3
6
610
650
690
730 nm
9
24
48 Std
650
695
+
-


Absorption
Abb. 17)
10-1 I/CO2 → Acetat
0.
3.
6
610
650
690
730 nm
9.
24.
48 Std
650
695

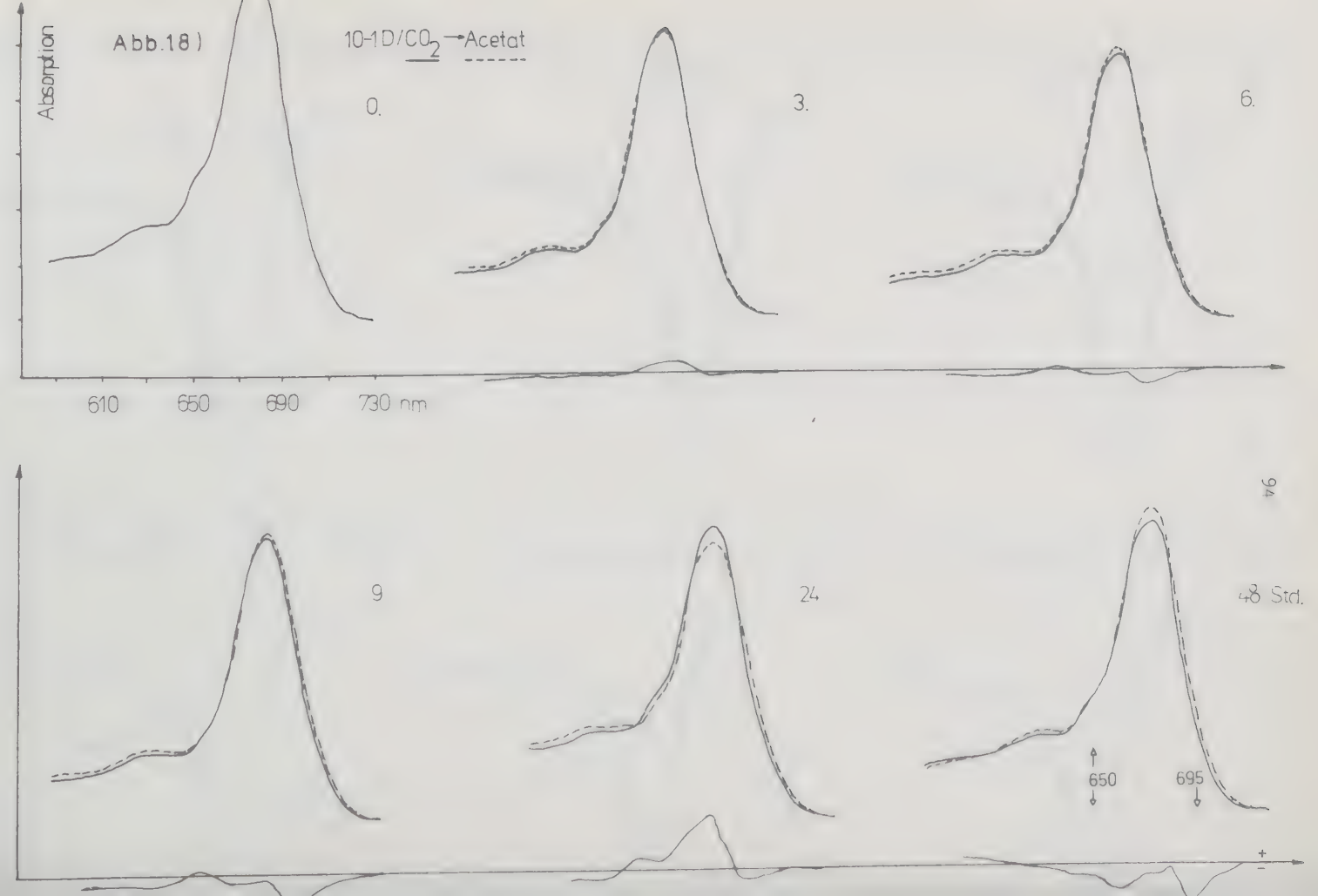


Abb.18)
10-1D/CO_2 → Acetat
Absorption
0.
3.
6.
9
24
48 Std.
650
695
610
650
690
730 nm

Diese Befunde korrelieren mit den bei den Wachstumsver=suchen ermittelten Ergebnissen, denen zufolge die Stämme E und H durch Ernährung mit Acetat in ihren Wachstums=leistungen am meisten gefördert werden. Sie zeigen auch in ihrem Absorptionsverhalten als Vertreter der photo=heterotrophen Gruppe die kürzeste Adaptationszeit beim ernährungsphysiologischen Übergang von der Autotrophie zur Photoheterotrophie. Sämtliche anderen Chlamydobotrys-Stämme (C,D und I) haben geringere photoheterotrophe Wachs=tumsleistungen und werden gegenüber autotropher Kultur durch Acetaternährung weniger gefördert als E und H. Als den photoautotrophen Stämmen zugehörig haben sie daher auch längere Anpassungszeiten an photoheterotrophe Kultur=bedingungen.

Bei einer Veränderung der C-Quelle vollziehen sich beim Stamm E nach Wießner und Amelunxen (1969 a,b) innerhalb der Adaptationszeit an die veränderten Ernährungsbedingungen nicht nur Änderungen der Chlorophyll-Proteid-Komplexe in den Chloroplastenmembranen, sondern ändert sich auch die gesamte elektronenmikroskopisch sichtbare Chloroplasten=struktur der Organismen, die in ursächlichem Zusammenhang mit den Unterschieden im Leistungsanspruch an den Photo=syntheseapparat, nämlich die Notwendigkeit eines offen=kettigen Elektronentransportes bei autotropher Ernährung und das optimale Ablaufen eines zyklischen PS-I-Systems bei photoheterotropher Kultur, stehen sollen.

8. Elektronenmikroskopische Befunde über die Chloroplastenstruktur der Chlamydobotrys-Stämme während photoautotrophen und photoheterotrophen Wachstums

Zur vergleichenden elektronenmikroskopischen Analyse wurde von allen Stämmen während der exponentiellen Wachstumsphase aus autotrophen und aus photoheterotrophen Kulturen Algenmaterial entnommen und auf ihre Feinstruktur untersucht, im wesentlichen auf die Ausbildung und das Vorhandensein der zu Doppelmembranen ("partitions") in Grana miteinander verbundenen Thylakoidmembranen, deren Anzahl zur Menge der voneinander isoliert liegenden Thylakoidmembranen in Beziehung gesetzt wurde. Denn beim Stamm E konnte nachgewiesen werden, daß eine "Granakonfiguration" im Chloroplasten für autotroph ernährten Chl. stellata charakteristisch ist und, zumindest zeitlich, mit guter Leistung der photosynthetischen CO_2-Fixierung korreliert (Wießner und Amelunxen 1969 b).

Im elektronenmikroskopischen Schnittbild zeigen fast alle untersuchten Chlamydobotrys-Stämme (Ausnahme Stamm H) eine deutliche Abhängigkeit der Chloroplastenstruktur von der Ernährungsart. Bei photoautotropher Kultur gleicht der Aufbau des Chloroplasten der Stämme C,D,E und I dem anderer Grünalgen, bis zu 77% der insgesamt vorhandenen Thylakoidmembranen sind zu "partitions" vereinigt (Tab. 14, Abb. 20.1). Beim Stamm I liegen nur ca. die Hälfte der vorhandenen

Membranen in Partition-Konfiguration vor (Tab. 14, Abb. 23.1), während der autotroph kultivierte Stamm H mit rund 30% den geringsten Anteil an "Doppelmembranen" besitzt (Tab. 14, Abb. 22.1). Es fällt auf, daß gerade diese beiden Stämme sich ebenfalls gegenüber den anderen durch ihr um 30% geringeres Chlorophyll/Protein-Verhältnis abheben (Kap. III.2, Tab. 1).

Bei photoheterotropher Kultur ergibt sich insgesamt für alle Chlamydobotrys-Stämme eine sehr einheitliche Chloroplastenstruktur. Die überwiegende Anzahl aller zumeist langgestreckten Thylakoidmembranen liegt voneinander isoliert und kontaktiert miteinander zu "Doppelmembranen" nur maximal zu 40% (Tab. 14, Stamm D und H, Abb. 20.1 und 22.1).

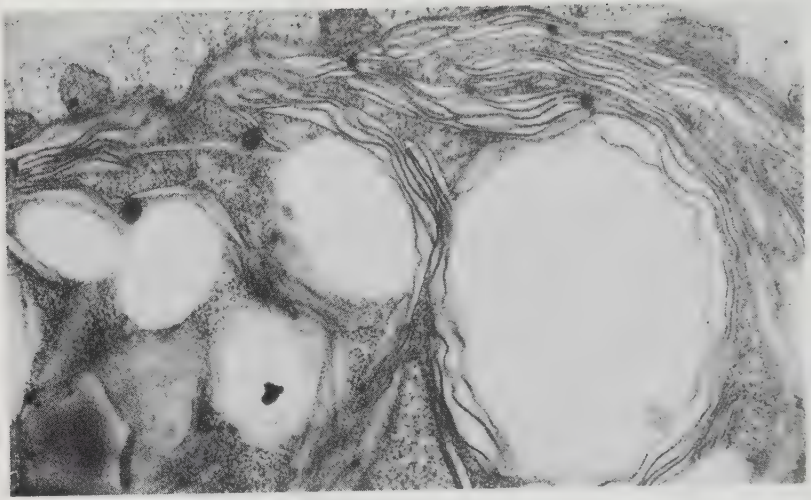
Vergleicht man bei den verschiedenen Stämmen die Abhängigkeit der submikroskopischen Chloroplastenstruktur von der Ernährungsart, so wird deutlich, daß bei H die Art der Kohlenstoffquelle - als einzigem Chlamydobotrys-Stamm - keinen wesentlichen Einfluß auf die Chloroplastenstruktur hat. Sowohl bei Autotrophie als auch bei Photo-Heterotrophie liegen hier nur ca. 30% bis 40% der Thylakoidmembranen als Partitionen vor und ist der größte Anteil der Thylakoidmembranen voneinander isoliert. Dies ist jedoch nur dann bei allen anderen Stämmen der Fall, wenn sie photoheterotroph kultiviert werden. Eine normale photosynthetische Ernährung mit CO_2 führt bei den Stämmen C,D,E und I zu deutlicher

"Granastruktur" in den Chloroplasten. Festzuhalten ist, daß bei den hier untersuchten Chlamydobotrys-Stämmen eine hohe Photosyntheseaktivität und ein hoher Anteil an "Doppel=membranen" nicht immer in unmittelbarer Beziehung zueinander stehen. Als Beweis sei angeführt, daß Stamm E nur einen um 25% größeren Anteil an "partitions" besitzt als I, seine photosynthetische Leistung ist jedoch wesentlich niedriger als die des Stammes I (Kap. III. 5.a). Eine optimale Photo=syntheseaktivität scheint - wie beim Stamm I - mindestens die Hälfte aller vorhandenen Chloroplastenmembranen in Partition-Konfiguration zu bedürfen. Sinkt hingegen der Anteil der "Doppelmembranen" unter 50% ab, wie beim Stamm H, so ist auch die Photosyntheseleistung gering.

Andererseits ist deutlich, daß eine Chloroplastenstruktur mit geringem Anteil an "Doppelmembranen" und hauptsächlich voneinander isoliert liegenden Thylakoiden auch nicht immer mit einer sehr hohen Fähigkeit zur Photoassimilation von Acetat verbunden ist. Dafür sprechen die stammspezi=fischen Eigenschaften von C und D als Vetreter der auto=trophen Gruppe mit nur geringen Acetat-Assimilationslei=stungen, obwohl auch sie die für photoheterotroph ernährte Algen typische Chloroplastenstruktur haben.

Stamm	C-Quelle während des Wachstums					
	CO_2			Acetat		
	Anteil der in "partition"-Konfiguration verbundenen Thylakoidmembranen					
	min		max	min		max
				1 ,0	27,1	31,4
				20,5	37,1	45,0	
				11,6	21,4	25,1
	17,0	22,5	30,5	31,0	38,0	46,7
				1,0	1,6	44,3

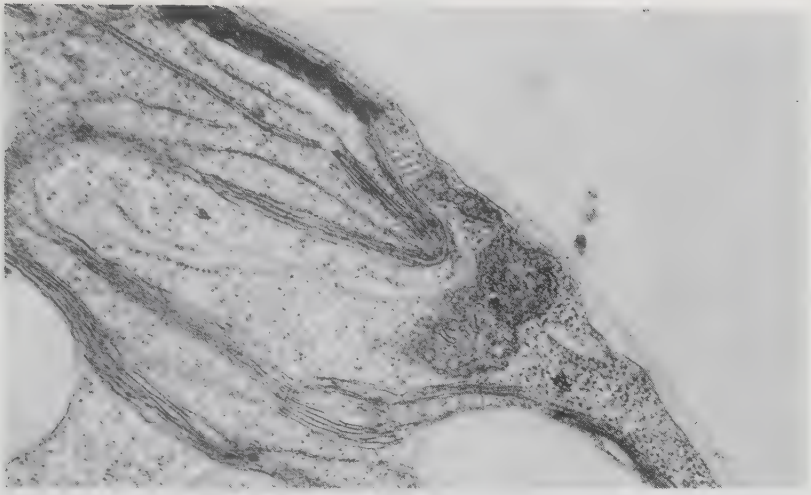
Tab. 14) Anteil der zu "partitions" verbundenen Thylakoid= membranen in v.H. der insgesamt vorhandenen Thylakoid= membranen bei verschiedenen Stämmen von Chl. stellata während autotropher (CO_2) und photoheterotropher (Acetat) Kultur



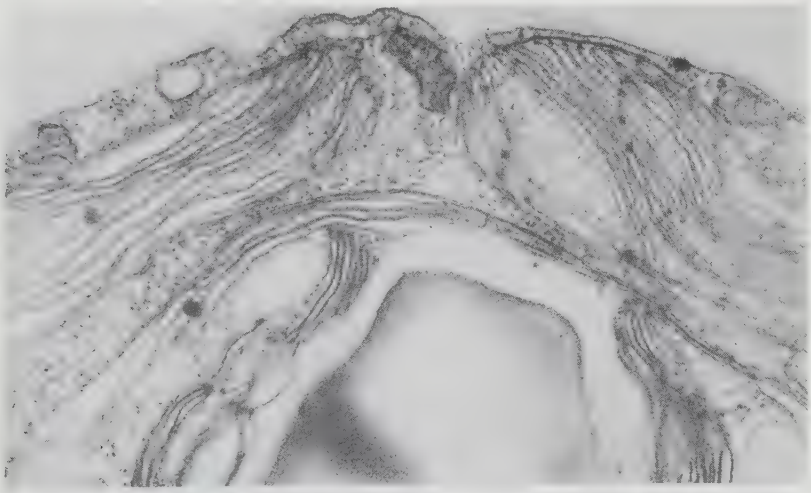
1

2

Abb. 19.1 und 2) Ausschnitt aus einer photoautotroph (1) und photoheterotroph (2) ernährten Zelle von Chl. stellata/Stamm C. 41000 : 1

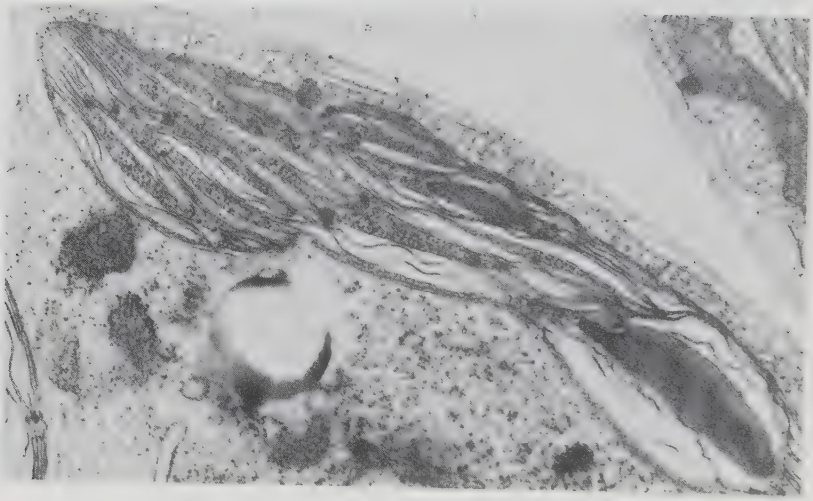


1

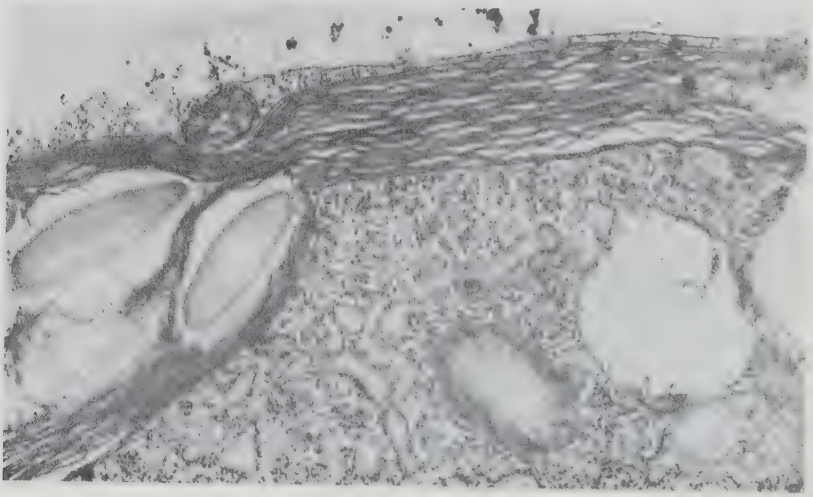


2

Abb. 20.1 und 2) Ausschnitt aus einer photoautotroph (1) und photoheterotroph (2) ernährten Zelle von Chl. stellata/Stamm D. 50500 : 1

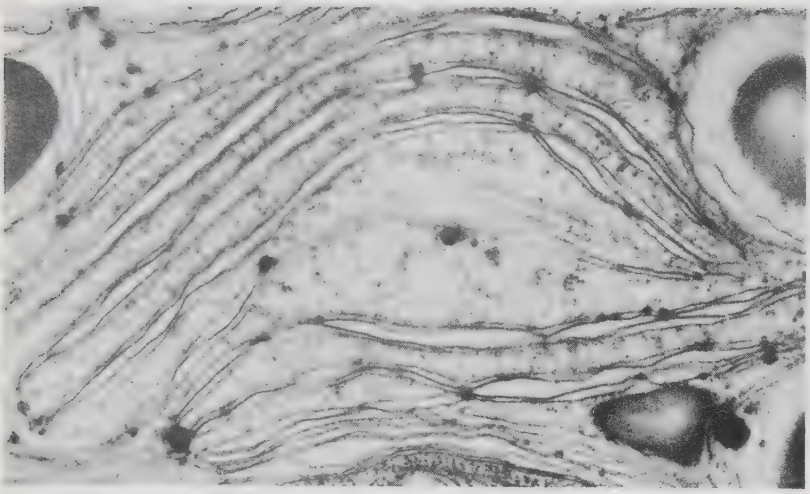


1

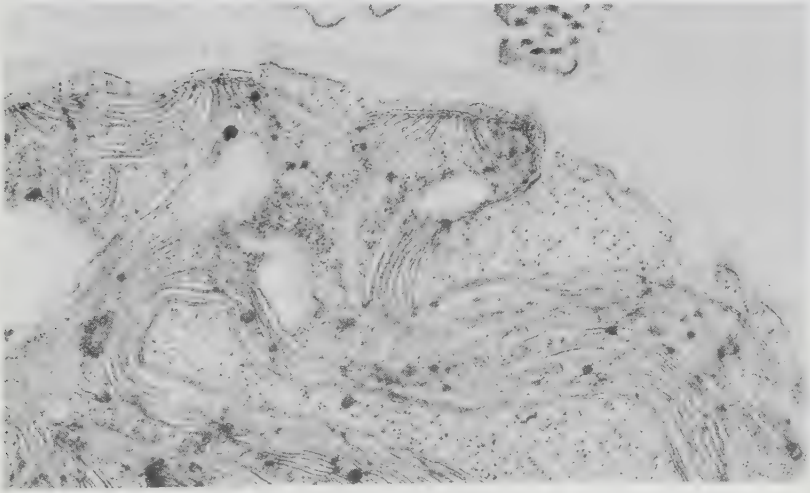


2

Abb. 21.1 und 2) Ausschnitt aus einer photoautotroph (1) und photoheterotroph (2) ernährten Zelle von Chl. stellata/Stamm E. 41000 : 1



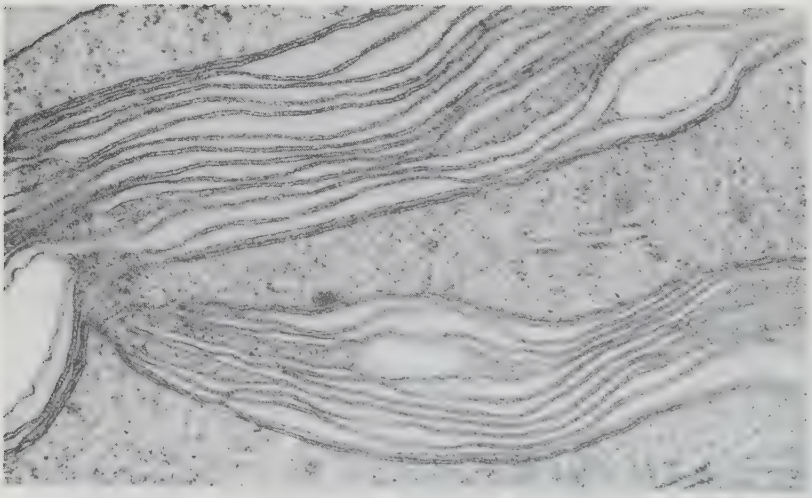
1



2

Abb. 22.1 und 2) Ausschnitt aus einer photoautotroph (1) und photoheterotroph (2) ernährten Zelle von Chl. stellata/Stamm H. 41000 : 1

1



2

Abb. 23.1 und 2) Ausschnitt aus einer photoautotroph (1) und photoheterotroph (2) ernährten Zelle von Chl. stellata/Stamm I. 41000 : 1

IV. Diskussion

Die zu den Volvocales gehörige Spondylomoraceengattung Chlamydobotrys vereint in sich eine große Anzahl weltweit verbreiteter Stämme, die nach den bisherigen Untersuchungen Korschikoff's (1924), von Pascher (1925), Schulze (1927), Strehlow (1928), Behlau (1935), Pringsheim und Pringsheim (1959), Pringsheim (1960) und (1969) im morphologischen Bau der Zellen und Kolonien teilweise verschiedenartig, jedoch durch mannigfaltige Übergänge miteinander verbunden sind, wodurch eine genauere Charakterisierung und taxonomische Abgrenzung der Stämme untereinander bisher nicht möglich war. Schon Pascher (1925) und Schulze (1927) zweifeln daher an den morphologischen Kriterien Korschikoff's (1924) - wie Gestalt und Aufbau der Zellen und Kolonien, Beschreibung der Chromatophoren und der Lage des Augenfleckes - zur Artenbestimmung der verschiedenen Chlamydobotrys-Stämme. Behlau (1935) entwirft schließlich für sieben Chlamydobotrys-"Arten" einen Bestimmungsschlüssel. Pringsheim (1960) kommt zu dem Ergebnis, daß innerhalb der Gattung Chlamydobotrys eine definierte Artunterscheidung aufgrund morphologischer Merkmale nicht zulässig ist und verweist auf (ernährungs)physiologische Unterschiede zwischen den Stämmen, die zur Unterscheidung der Stämme voneinander besser geeignet wären.

Die Verwendung ausschließlich physiologischer Merkmale als taxonomische Kriterien zur Algensystematik wird jedoch von verschiedenen Seiten, so z.B. von Moewus (1933) und Gerloff (1940), abgelehnt, selbst wenn die klassischen morphologisch-cytologischen Merkmale zur Artenbestimmung nicht ausreichen. Nach ihrer Meinung stehen die physiologischen Merkmale in ihrem systematischen Wert hinter den morphologischen zurück. Andererseits legt die Arbeitsgruppe um Kessler (1974; vgl. dort zit. Lit.) gerade auf die physiologisch-biochemische Taxonomie zur Charakterisierung von Arten verschiedener Algenstämme besonderen Wert: 51 autotrophe Stämme verschiedener Chlorella-Arten wurden aufgrund ihres Säureresistenzverhaltens auf sieben Arten zurückgeführt (Kessler, 1965). Mittlerweile liegen aufgrund der von Kessler (1972) an weiteren Stämmen beschriebenen physiologischen Merkmale zwölf Taxa innerhalb der Gattung Chlorella vor. Weitere Isolierungen von Chlorella-Stämmen würden wahrscheinlich neue Taxa liefern. Einschränkend ist hierzu jedoch anzumerken, daß im Allgemeinen mit der Bewertung eigenständiger Arten aufgrund physiologischer und biochemischer Merkmale besonders kritisch umzugehen ist. Die in neuerer Zeit von Shihira und Krauss (1965) anhand ernährungsphysiologischer Unterschiede vorgenommene Klassifizierung von 41 Stämmen zu 30 Taxa innerhalb der Gattung Chlorella unterscheidet sich prinzipiell nicht mehr von den ausufernden ausschließlich anatomisch, morphologischen

Beschreibungen älterer Autoren, z.B. Gerloff (1940) bei Chlamydomonas oder Behlau (1935) bei Chlamydobotrys. Es scheint demnach nicht angebracht, bei der Vielzahl der vorhandenen Stämme einzelne Stämme mit Art- oder Varietätsnamen zu belegen und dabei an einem jetzt physiologisch definierten Artbegriff festzuhalten. Vielmehr sollte eine vergleichende physiologisch-biochemische Untersuchung mehrerer Stämme nur zu physiologisch gut definierten Gruppen führen, die jeweils mehrere physiologisch ähnliche und nicht identische, aber nicht prinzipiell unterschiedliche Stämme zusammenfassen. Dies soll in besonderem Maße für die hier untersuchte und von Pringsheim (1969) als Sammelart (Gruppe) zusammengefaßten Stämme von Chlamydobotrys stellata gelten.

Innerhalb der Gruppe Chlamydobotrys stellata ergibt sich bereits aufgrund der einfachen ernährungsphysiologischen Experimente von Pringsheim (1960) eine gewisse Differenzierung der Stämme in zwei Gruppen. In die erste gehören solche Stämme, "die sich am schnellsten" in organischer Nährlösung (verdünnte "Euglena-gracilis-Lösung") "entwickeln", wie die Stämme C,D und I. In die zweite Gruppe gehören solche, die sich langsamer entwickeln, wie E und H. Diese Gruppeneinteilung aufgrund ihres Wachstumsverhaltens konnte für die hier überprüften Chlamydobotrys-Stämme unter einheitlichen photoautotrophen Ernährungsbedingungen be=

stätigt werden, und ebenso bei photoheterotropher Ernährung (Kap. III. 2 und 3). Hierbei ergab sich, daß Stämme mit hohen photoheterotrophen nur geringe autotrophe Wachstumsleistungen haben bzw. vice versa (Kap. III. 4, Tab. 3). Aus den ernährungsphysiologischen Versuchen kann daher abgeleitet werden, daß innerhalb dieser Sammelart von Grünalgen wachstumsphysiologische Fähigkeiten sowohl zur Photo-Autotrophie als auch zur Photo-Heterotrophie vorliegen, die stammspezifisch für C,D,I (autotroph) oder für E,H (photoheterotroph) und eindeutig taxonomisches Merkmal dieser Chlamydobotrys-Stämme sind.

Stoffwechselphysiologische Grundlage dieses Wachstumsverhaltens sind bei den Stämmen der autotrophen Gruppe eine hohe Photosyntheseleistung (Kap. III. 5.a) bzw. bei den zur photoheterotrophen Gruppe zählenden Stämmen E und H eine besondere Fähigkeit zur Photoassimilation von Acetat (Kap. III. 5.c.1 und 2).

Auf der Ebene der Biochemie zeigt sich diese Stammspezifität darin, daß die Aktivität des CO_2-fixierenden Enzyms Carboxydismutase bei den Stämmen des autotrophen Typs C und D durch Acetat-Ernährung kaum beeinflußt wird (Kap. III. 5.b, Tab. 7) und daß bei diesen Stämmen während photoheterotropher Ernährung die Aktivität des "Leitenzyms" im Glyoxylsäurezyklus Isocitratlyase niedriger (Kap. III.

5.c.3, Tab. 10) und damit auch die Fähigkeit zur Acetat=assimilation im Licht geringer als bei denen der photo=heterotrophen Gruppe ist (Kap. III. 5.c.2). Wesentlich ist ferner, daß DCMU als Hemmstoff der Photosynthese die Acetatassimilation der autotrophen Stämme in hohem Maße unterbinden kann und den Anteil des bei der Acetatver=arbeitung freigesetzten CO_2 drastisch erhöht (Kap. III. 5.c.4). Dies bedeutet, daß die C-Assimilation aus Acetat im Licht bei diesen Stämmen vorwiegend auf indirektem Wege über die photosynthetische Fixierung von oxidativ aus Acetat freigesetztem Kohlendioxid erfolgt (= indirekte C-Fixierung aus Acetat; Wießner 1968, 1969). Diese Tatsache gilt nicht nur bei autotropher Anzucht der Stämme. Auch bei photoheterotropher Kultur bedienen sich die Stämme der autotrophen Gruppe vorwiegend der Photosynthese zur C-Fixierung aus Acetat, obwohl die Photosyntheseleistung als Folge der photoheterotrophen Ernährung erniedrigt und im Stoffwechsel aufgrund der vorhandenen Enzymaktivi=täten eine direkte Assimilation von Acetat über den Glyoxylsäurezyklus möglich ist.

Andererseits ist die Aktivität der Carboxydismutase bei den Stämmen der photoheterotrophen Gruppe (E und H) deutlich niedriger als bei den autotrophen Stämmen. Durch DCMU kann nur eine schwache Senkung der Acetatassimilation im Licht um maximal 30% erzielt werden, ohne daß die Menge des frei=

gesetzten CO_2 sich gleichzeitig erhöht (Kap. III. 5.c.4). Dies bedeutet, daß diese Stämme Acetatkohlenstoff vorwiegend direkt assimilieren (= direkte C-Assimilation aus Acetat), und eine Beteiligung der Photosynthese am Prozeß der Acetatassimilation bei den Stämmen des photoheterotrophen Typs nur gering ist. Spezifisch für diese Stämme ist ferner, daß die für photoheterotrophe Ernährungsbedingungen ermittelte Aktivität der Isocitratlyase durch autotrophe Kultur höchstens um 50% gesenkt wird und stets eindeutig nachweisbar ist. Die Photo-Assimilationsleistung von Acetat ist auch nach autotropher Kultur groß (Kap. III. 5.c.2).

Diese Ergebnisse lassen insgesamt die Schlußfolgerung zu, daß die Art der als C-Quelle gebotenen Verbindung (CO_2 oder Acetat) die Wachstumsintensität und das physiologische Verhalten der verschiedenen Chlamydobotrys-Stämme nur insoweit bestimmen kann, wie dies durch den in dem jeweiligen Stamm spezifisch vorherrschenden Stoffwechselweg möglich ist, obwohl gleichzeitig durch die angebotene C-Quelle eine alternative Möglichkeit zur C-Assimilation induziert wird. Denn festzuhalten ist, daß die Stämme C und D auch bei Acetat-Ernährung ihren - physiologisch definierten - autotrophen Charakter beibehalten und den - wenngleich in seiner Leistung als Folge der Photoheterotrophie zwar verringerten - autotrophen Stoffwechselweg zur C-Assimilation

aus Acetat einsetzen, während E und H auch bei Ernährung mit CO_2 ihre photoheterotrophen Eigenschaften nicht ver= lieren. Diese Unterscheidung der Chlamydobotrys-Stämme in zwei Gruppen wird generell dadurch nicht aufgehoben, daß Stamm I bei photo-heterotropher und -autotropher Kultur an= hand der angeführten physiologisch-biochemischen Kriterien keiner der beiden Gruppen eindeutig zuzuordnen ist.

Die stammspezifischen Eigenschaften von Chlamydobotrys sind auch auf cytologisch-biochemischer Ebene bei der sub= mikroskopischen Chloroplastenstruktur und dem in vivo Absorptionsverhalten nachweisbar (Kap. III. 8 und 7). So ist für den Vertreter der photoheterotrophen Gruppe, den Stamm H, charakteristisch, daß das Fehlen der - für Acetat= ernährung typischen - Granastruktur auch bei photoauto= tropher Ernährung im wesentlichen beibehalten wird: nur ca. 30% bis 40% der insgesamt vorhandenen Membranen sind zu "Granathylakoiden" miteinander verbunden. Beim Stamm D als Vertreter des autotrophen Typs tritt zwar unter photo= heterotrophen Bedingungen die für diese Ernährungsweise typische Chloroplastenstruktur auf, doch fehlt das für photoheterotroph kultivierte Algen charakteristische Ab= sorptionsverhalten, das generell bei allen Stämmen der autotrophen Gruppe nur in geringem Maße und auch erst nach längerer autotropher Kultur (Stamm C und I) oder überhaupt nicht (Stamm D) nachweisbar ist.

Welches Bild ergibt sich nun bei kritischer Wertung der bisher zusammenfassend diskutierten Befunde über die physiologischen, biochemischen sowie cytologischen Eigenschaften der untersuchten Chlamydobotrys-Stämme? Festzuhalten ist, daß die beiden theoretisch vorstellbaren Extreme im physiologischen Verhalten, nämlich der ausschließlich photoheterotrophe und der ausschließlich autotrophe Typ bei den Chlamydobotrys-Stämmen nicht vorkommen.(Dagegen spricht auch theoretisch schon die für alle Grünalgen nachweisbare ernährungsphysiologische Variationsbreite der Organismen.) Der extrem autotrophe Stamm, sowie der extrem photoheterotrophe Stamm müßte die folgenden in der Tabelle 15 zusammengefaßten Eigenschaften besitzen.

Tab.15)

	extrem autotrophe und photoheterotroph extreme Eigenschaften	Stamm				Eigenschaften
	CO_2 →	C	D	I	E	H ←····· Acetat
Wachstumsleistung 1)	x	x	x	x	x	(x) –
2)	–	x	(x)	x	x	x x
Photosynthese=leistung	x	x	x	x	x	(x) –
Fähigkeit zur Photoassimilation von Acetat	–	(x)	(x)	x	x	x x
Aktivität der Carboxydismutase	x	x	x	(x)	(x)	(x) –
Aktivität der Isocitratlyase	–	(x)	(x)	x	x	x x
Fähigkeit zur indirekten C-Assimilation aus Acetat	x	x	x	–	–	– –
Fähigkeit zur direkten C-Assimilation aus Acetat	–	–	–	x	x	x x
Thylakoidmembranen vorw. in Grana-Konfiguration 1)	x	x	x	(x)	x	– –
Thylakoidmembranen vorw. voneinander isoliert 2)	–	x	x	x	x	x x
> Chlorophyll-b-Gehalt und < Absorption bei λ 695 nm 1)	x	x	x	x	(x)	(x) –
< Chlorophyll-b-Gehalt und > Absorption bei λ 695 nm 2)	–	(x)	(x)	(x)	x	x x

1) bei autotropher Ernährung, 2) bei photoheterotropher Ernährung

x = vorhanden, (x) = schwach vorhanden, – = nicht vorhanden

Ein Vergleich des in der Tab. 15) für die verschiedenen Stämme von Chlamydobotrys zusammengefaßten Ausmaßes an jeweils vorhandenen autotrophen und photoheterotrophen Eigenschaften mit den Extremfällen zeigt eindeutig, daß es bei den in dieser Arbeit untersuchten physiologischen, biochemischen sowie cytologischen Merkmalen ebenso wie bei den von anderer Seite angewandten anatomisch-morphologischen Unterscheidungskriterien eine Vielfalt von Übergängen gibt, die nur - wie oben geschehen - eine Unterteilung in zwei Gruppen, den autotrophen und den photoheterotrophen Typ, zulassen. Physiologische Merkmale die zur Aufstellung von eindeutigen physiologischen Arten innerhalb der "Gattung" Chlamydobotrys verwendet werden könnten, sind nicht vorhanden. Vielmehr ist die durch Pringsheim vorgeschlagene Bezeichnung der Sammelart Chlamydobotrys stellata beizubehalten, in der mehrere (ernährungs)physiologische Varietäten (= Rassen) zusammengefaßt werden. Diese Aussage behält angesichts der bisher ungenügenden Kenntnisse über die genetischen Eigenheiten und die Sexualität der verschiedenen Chlamydobotrys-Stämme zumindest so lange ihre Gültigkeit, bis z.B. das für die einzelnen Stämme nachgewiesene autotrophe bzw. photoheterotrophe Verhalten als eindeutige Artmerkmale bewiesen sind. Mit Sicherheit handelt es sich jedoch bei den verschiedenen Stämmen nicht um modifizierbare physiologische Variationen (= Varianten, Modifikationen).

Diese Tatsache ist umso bemerkenswerter, wenn man die Herkunft (= Fundort) der verschiedenen Chlamydobotrys-Stämme miteinander vergleicht und versucht mit ihrem Wachstums= verhalten bzw. mit ihren physiologischen Leistungen in Beziehung zu setzen. Ein derartiger Vergleich läßt keine unmittelbaren Korrelationen erkennen. Denn z.B. konnte Stamm L, der mit Stamm I aus einem Teich in Seattle, State of Washington/USA isoliert wurde, unter den gegebenen Be= dingungen, sowie nach Änderung mehrerer Kulturbedingungen weder photoautotroph mit CO_2 noch photoheterotroph mit Acetat zur Massenkultur gebracht werden. Oder es verhalten sich die Stämme C und D mit Bezug auf die C-Fixierung aus Acetat identisch, ihre Fundorte liegen jedoch weit aus= einander in Nordamerika und in Europa. Diese Aussagen sind allerdings nur relativ zu werten, da exakte mikroklimatische und ökologische Daten als einziger Maßstab für die Beurtei= lung der natürlichen Bedingungen am Fundort nicht vorhanden sind.

V. Zusammenfassung

Mehrere Stämme der kosmopolitisch verbreiteten volvocalen Grünalge Chlamydobotrys stellata (C,D,E,H und I) wurden a) unter einheitlichen Bedingungen sowohl photoautotroph mit CO_2 als auch photoheterotroph mit Acetat kultiviert und b) auf ihr stammspezifisches Wachstumsverhalten hin untersucht, sowie c) dessen stoffwechselphysiologischen und biochemischen Ursachen und d) den cytologischen Gegebenheiten, der von der Ernährungsweise beeinflußbaren submikroskopischen Chloroplastenstruktur nachgegangen. Hierbei wurde festgestellt:

1) Die fünf überprüften Stämme der untersuchten Sammelart (Gruppe) Chl. stellata unterscheiden sich ernährungsphysiologisch voneinander. Stämme mit hohen autotrophen haben nur geringe photoheterotrophe Wachstumsleistungen und vice versa. Aufgrund der stammspezifischen Differenzierungen kann eine physiologisch autotrophe (C,D und I) und eine physiologisch photoheterotrophe Gruppe (E,H) voneinander unterschieden werden.

2) Stoffwechselphysiologische Grundlage der zur photo-autotrophen bzw. zur -heterotrophen Gruppe gehörenden Stämme sind zum einen eine hohe Photosynthese- und zum anderen eine hohe lichtabhängige Leistung der Acetatassimilation. Dies gilt für die Stämme der photoheterotrophen Gruppe auch

dann, wenn sie photoautotroph kultiviert werden.

3) Die Aktivität des für die CO_2-Fixierung verantwortlichen Enzyms Carboxydismutase ist bei den Stämmen des autotrophen Typs höher als bei dem des photoheterotrophen Typs, die jedoch eine höhere Aktivität des "Leitenzyms" im Glyoxlsäurezyklus Isocitratlyase haben.

4) Die Stämme des autotrophen Typs assimilieren Acetatkohlenstoff im Licht vorwiegend auf indirektem Wege über die photosynthetische Fixierung von aus Acetat oxidativ freigesetztem Kohlendioxid. Die Stämme des photoheterotrophen Typs assimilieren Acetatkohlenstoff vorwiegend auf direktem Wege unter Beteiligung des Glyoxylsäurezyklus.

5) Die Beteiligung der ATP-liefernden Photoprozesse an der Acetatassimilation wird im Zusammenhang mit dem Quantenbedarf der Acetatassimilation bei den verschiedenen Chlamydobotrys-Stämmen diskutiert. Für die Acetatkohlenstoff auf direktem Wege assimilierenden Stämme ergibt sich eine hohe Quantenausbeute im nahen Infrarot ($\lambda > 700$ nm) in dem ausschließlich das PS I den ATP-Bedarf mittels zyklischer Photophosphorylierung deckt. Bei den Acetatkohlenstoff indirekt assimilierenden Stämmen ist oberhalb λ 700 nm die lichtabhängige C-Assimilation aus Acetat nicht mehr nachweisbar (Quantenzahl = 0). Hier ist nicht der zyklische, sondern vielmehr der offenkettige Elektronentransport an der Photoassimilation von Acetat beteiligt.

6) Das Absorptionsverhalten und die elektronenmikroskopisch sichtbare Chloroplastenstruktur bestätigen die Charakterisierung der Chlamydobotrys-Stämme in eine autotrophe und in eine photoheterotrophe Gruppe. Einerseits zeigen die Stämme des autotrophen Typs (C und I) beim Übergang von der Autotrophie zur Photo-Heterotrophie erst nach längerer photoheterotropher Kultur das für Acetat ernährte Algen typische Absorptionsspektrum oder sie ändern ihr für autotrophe Ernährung charakteristisches Absorptionsspektrum bei Photo-Heterotrophie überhaupt nicht (Stamm D). Andererseits zeigt der zum photoheterotrophen Typ gehörende Stamm H, als einziger Chlamydobotrys-Stamm, auch bei autotropher Ernährung vorwiegend die für Photo-Heterotrophie typischen isolierten Thylakoidmembranen. Hierin unterscheidet er sich innerhalb der photoheterotrophen Gruppe deutlich vom Stamm E.

7) Die vorgelegten Daten der hier vorgenommenen vergleichenden physiologisch-biochemischen, sowie cytologischen Untersuchungen deuten daraufhin, daß viele der ermittelten stammspezifischen Eigenschaften als taxonomische Merkmale anzusehen sind, die innerhalb der Sammelart Chlamydobotrys den verschiedenen Stämmen den Charakter von physiologisch autotrophen oder photoheterotrophen Varietäten verleihen.

VI. Literaturverzeichnis

1. Behlau, J. (1935)
Beitr. Biol. Pflanzen 23, 125-166

2. Danforth, W.F. (1961)
J. Protozool. 8, 152-158

3. Dixon, G.H., and H.L. Kornberg (1959)
Biochem. J. 72, 3 P

4. French, C.S. (1937)
J. Gen. Physiol. 20, 711-735

5. French, C.S., and V.M.K. Young (1956)
Radiation Biology, ed. A. Hollaender, Vol. 3,
343-391, New York, McGraw-Hill

6. Gaffron, H. (1939)
Biol. Zentralbl. 59, 288-302

7. Gerloff, J. (1940)
Arch. Protistk. 94, 311-502

8. Goulding, K.H., and M.J. Merrett (1967)
J. gen. Microbiol. 48, 127-136

9. Hoogenhout, T., and J. Amesz (1965)
Arch. Mikrobiol. 50, 10-25

10. Iggena, M.L. (1938)
Arch. Mikrobiol. 9, 129-166

11. Kessler, E. (1965)
Arch. Mikrobiol. 52, 291-296

12. Kessler, E. (1972)
Arch. Mikrobiol. 87, 243-248

13. Kessler, E. (1974)
Arch. Mikrobiol. 100, 51-56

14. Kirk, J.T.O. (1968)
Planta 78 (Berl.), 200-207

15. Kok, B. (1960)
Encyclopedia of Plant Physiology, Vol. V, 566-633
(ed. A. Pirson), Springer-Verlag, Berlin

16. Kornberg, H.L. (1966)
Essays in Biochemistry, Vol. 2, 1-31
ed. by P.N. Campbell, and G.D. Greville,
Academic Press, New York

17. Korschikoff, A.A. (1924)
Arch. Russ. Protistol. 3, 45-56

18. Kuhl, A., and H. Lorenzen (1964)
Meth. in Cell Physiol., Vol. 1, 159-187,
ed. D.M. Prescott, Academic Press, New York

19. Luft, J.H. (1961)
J. biophys. biochem. Cytol. 9, 409-414

20. Mackinney, G. (1941)
J. Biol. Chem. 140, 315-322

21. Merrett, M. (1969)
Arch. Mikrobiol. 65, 1-11

22. Moewus, F. (1933)
Arch. Protistk. 80, H. 1.

23. Palade, G.E. (1952)
J. exp. Med. 95, 285-298

24. Pascher, A. (1925)
Arch. Protistk. 52, 565-584

25. Pirson, A. und H. Lorenzen (1958)
Z. Bot. 46, 53-67

26. Pringsheim, E.G. (1960)
Österr. Bot. Z. 107, 425-438

27. Pringsheim, E.G. (1969)
Ber. Dtsch. Bot. Ges. 82, 265-274

28. Pringsheim, E.G. und O. Pringsheim (1959)
Biol. Zentralbl. 78, 937-971

29. Pringsheim E.G., and W. Wießner (1960)
Nature 188 (London), 919-921

30. Pringsheim, E.G. und W. Wießner (1961)
Arch. Mikrobiol. 40, 231-246

31. Roe, J.H. (1955)
J. Biol. Chem. 212, 335-343

32. Reynolds, E.S. (1963)
J. Cell Biol. 17, 208-213

33. Russel, G.K., and M. Gibbs (1966)
Plant Physiol. 41, 885-890

34. Schlegel, H.G. (1969)
Allgemeine Mikrobiologie, Georg Thieme,
Stuttgart

35. Schulze, B. (1927)
Arch. Protistk. 58, 508-576

36. Shihira, I., and R.W. Krauss (1965)
Chlorella. Physiology and taxonomy of forty-one isolates. College Park, Maryland: University of Maryland, 1-97

37. Stein, F. (1878)
Der Organismus der Infusionsthiere 3, Taf. XVIII, Fig. 30-34, Leipzig

38. Strehlow, K. (1929)
Z. Bot. 21, 625-692

39. Truesdale, G.A., A.L. Downing, and G.F. Lowden (1955)
J. Appl. Chem. 5, 53-62

40. Warburg, O., and E. Negelein (1928)
Biochem. Z. 200, 416

41. Wiame, J.M. (1957)
Advanc. Enzymol. 18, 241-280

42. Wießner, W. (1960)
Flora 149 (Jena), 1-42

43. Wießner, W. (1962)
Arch. Mikrobiol. 43, 402-411

44. Wießner, W. (1965)
Nature 205 (London), 56-57

45. Wießner, W. (1966)
Ber. Dtsch. Bot. Ges. 79, 58-62

46. Wießner, W. (1968)
Planta 79 (Berl.), 92-98

47. Wießner, W. (1969)
Photosynthetica 3 (Prag), 225-232

48. Wießner, W. (1970)
Photobiology of microorganisms, 95-133
ed. Per Halldal, Bartolomew press, Dorking

49. Wießner, W. und F. Amelunxen (1969 a)
Arch. Mikrobiol. 66, 14-24

50. Wießner, W. und F. Amelunxen (1969 b)
Arch. Mikrobiol. 67, 357-369

51. Wießner, W., and C.S. French (1970)
Planta 94 (Berl.), 78-90

52. Wießner, W., and H. Gaffron (1964)
Fed. Proc. 23, I, 226

53. Wießner, W. und A. Kuhl (1962)
Vorträge aus dem Gesamtgebiet der Botanik,
Neue Folge Nr. 1, 102-108
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

Lebenslauf

Walter Eduard Sandrock, geboren am 13.7.1946 in Sanders=
hausen bei Kassel als Sohn des Schlossers Georg Sandrock
und seiner Ehefrau Dorothea, geb. Holz.

1952 - 1956 Volksschule in Sandershausen

1956 - 1962 Realschule in Kassel

1962 - 1966 Goethe-Gymnasium in Kassel

11.2.1966 Reifeprüfung

SS 1966 Beginn des Studiums der Geographie und Mathematik an der Georg-August-Universität Göttingen

WS 1966/67 Beginn des Studiums der Biologie und Chemie

WS 1968/69 Zwischenprüfung in Biologie

SS 1969 Vorprüfung in Chemie

23.6.1972 Staatsexamensprüfung in der Fachkombination Biologie, Chemie und Pädagogik sowie Diplom-Biologen-Hauptprüfung

WS 1972 Beginn der vorliegenden Dissertation unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. W. Wießner am Pflanzenphysiologischen Institut

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren:

Ax, Birukow, Brockmann, Ellenberg, Fischer, Glemser, Graebe, Hilsch, Koch, Lorenzen, Piepho, Pirson, Tütken, Wießner